

**Verteilung von Eisenionen
in Kälberlinsen
und ihr Beitrag zur Modifikation von Linsenprotein**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**vorgelegt von
Mischa André Timo Kleine-Reidick
aus Bonn-Duisdorf**

2005

**Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Breipohl**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. P. Roggenkämper**

Tag der mündlichen Prüfung: 02/03.08.2005

**Aus dem Institut für Experimentelle Ophthalmologie, später Bonn
Department of International Medical Education and Development (Bonn
MED ID)
Direktor: Prof. Dr. med. W. Breipohl**

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

<u>Kapitel</u>	<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
1	Einleitung und Zielsetzung	6-12
1.1	Einleitung.....	6-10
1.2	Zielsetzung.....	11-12
2	Material und Methoden	13-29
2.1	Präparation von bovinen Linsen und Extraktion von Proteinen.....	13-17
2.2	Bestimmung des Eisen und Kupfergehaltes von Proteinen.....	17-23
2.2.1	Eisenionenbestimmung unter Verwendung von Ferrene S.....	17-21
2.2.2	Kupferionenbestimmung unter Verwendung von BCS.....	21-22
2.2.3	Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung nach Bradford.....	23
2.3	Bestimmung des Fruktosamingehaltes von Proteinen mit Hilfe von NBT.....	23-24
2.4	Messung. des Gehaltes an Carbonylgruppen von Proteinen.....	25-27
2.4.1	Messung des Hydrazongehaltes mit DTNB.....	25-26
2.4.2	Messung der Proteinkonzentration einer Lösung mit BCA.....	26-27
2.5	Messung von Sulfhydrylgruppen in Protein vor und nach Reduktion.....	27-29
3	Ergebnisse	30-45
4	Diskussion	46-64
5	Schlussfolgerungen	65-66
6	Zusammenfassung	67-68
7	Literaturverzeichnis	69-74
8	Anhang	75-79
8.1	Auflistung sämtlicher Agenzien, Materialien und Geräte.....	75-76
8.2	Danksagung.....	77
8.3	Abkürzungsverzeichnis (aufklappbar).....	78
8.4	Lebenslauf.....	79

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Die Anforderungen an die Linse des Auges sind komplex: Zwischen Hornhaut und Netzhaut gelegen, besteht ihre Aufgabe darin, die einfallenden Lichtstrahlen durch ihre variable Form und Brechkraft punktgenau auf der Netzhaut zu vereinen. Von entscheidender Bedeutung ist dabei ihre ungetrübte Lichtdurchlässigkeit. Die Linsenfasern zeichnen sich durch ihren sehr hohen Proteingehalt aus, der beim Menschen etwa 35% Feuchtgewicht beträgt, der größte Teil hiervon ist wasserlöslich. Über 90% ihres Gehaltes an wasserlöslichem Protein entfallen auf die Kristalline (**Reddy et al., 2001**). Diese Strukturproteine lassen sich nach ihrem Molekulargewicht in die Gruppen α , β und γ -Kristallin, diese wiederum in zahlreiche Untergruppen einteilen. Eine unversehrte molekulare Struktur der Kristalline ist verantwortlich für die optischen Eigenschaften der Linse. Da die Linse weder Nerven noch Blutgefäße enthält, findet die Ernährung des Linsengewebes ausschließlich durch Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Kammerwasser statt. Die Stoffwechselaktivität der Linse ist, abgesehen von ihrem Epithel an der Vorderfläche, extrem gering. Aus diesem Grunde werden Biomoleküle wie die Kristalline der Linsenfasern nicht ersetzt, Proteinmodifikationen und -schäden sind somit irreversibel und akkumulieren mit der Zeit. Dadurch verändert sich im Laufe des Lebens die Zusammensetzung der Linsenproteine. Der Anteil des wasserlöslichen Proteins nimmt zugunsten des unlöslichen ab, gleichzeitig lassen sich zunehmend modifizierte Aminosäuren in den Linsenproteinen finden (**Bloemendal, 1982**). Überschreiten diese Veränderungen ein bestimmtes Maß, trübt sich die Linse ein. Die verminderte Lichtdurchlässigkeit kann die Funktion des Auges bis zur Erblindung durch Katarakt einschränken.

Die Katarakt ist weltweit Erblindungsursache Nummer eins (**Fu et al., 1998**). Sie betrifft vorwiegend ältere Menschen sowie Diabetiker und stellt für die Betroffenen eine starke Einschränkung der Lebensqualität dar. Die einzige Therapie ist die chirurgische Entfernung der opaken Linse und Implantation einer Kunstlinse. Bei Patienten über 65 Jahren macht diese operative Behandlung der Katarakt die häufigste Indikation zu einem chirurgischen Eingriff am Auge aus (**Spector, 1995**). Die weltweite Bedeutung dieser Erkrankung wird deutlich, wenn man bedenkt, dass in den Industrieländern der Anteil der vornehmlich betroffenen Bevölkerung ab einem Lebensalter von 55 Jahren und aufwärts in den nächsten Jahrzehnten statistisch stark

zunehmen wird. Bereits heute macht die Behandlung der Katarakt einen beträchtlichen Teil der Gesundheitsbudgets der USA aus. **Spector** gibt für 1995 einen Anteil von etwa 12% an. Anders sieht es in den Entwicklungsländern aus. Hier ist der Zugang zu einer augenärztlichen Behandlung oft nur wenigen vorbehalten, so dass die Entstehung einer Katarakt für die Betroffenen sehr oft endgültige Erblindung zur Folge hat.

Sowohl Ursache als auch Ausprägung des grauen Stars können unterschiedlicher Natur sein, und entsprechend variieren auch die wissenschaftlichen Klassifizierungsversuche. Neben einer Klassifikation der Katarakt nach Farbe oder Lokalisation der Eintrübungen in der Linse erlauben die Begleitumständen bzw. Auslösefaktoren, die zu ihrer Entwicklung geführt haben, eine Differenzierung in z.B. drei Klassen (**Domscheit, 1998**).

- altersassoziiertes Star (Cataracta senilis)
- Star im Rahmen von Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes (Cataracta diabetica)
- durch UV-Einstrahlung hervorgerufenes Star

Diesen Formen der Kataraktentwicklung liegen auf molekularer Ebene Reaktionen zugrunde, die einige Parallelen und Gemeinsamkeiten aufweisen. In allen Fällen werden die Kristalline durch verschiedene, reaktive Sauerstoffspezies, sogenannte ROS (reactive oxygen species) verändert. Hierunter fallen vor allem das Hydroxylradikal (OH^\cdot), das Superoxidradikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (**Garland, 1990; Obara, 1995; Spector, 1995**). Bei der Reaktion der ROS mit den Kristallinen kommt es unter anderem zu Konformationsänderungen der Proteinmoleküle, zu Quervernetzung, damit zu einer verminderten Wasserlöslichkeit, Farbveränderungen und zu einer erhöhten Fluoreszenz des Proteins. Diese Vorgänge sind typische Parameter von Gewebsalterung. Bei der Linse gehen sie mit einer verminderten Transparenz einher (**Baynes, 1991; Wolff et al., 1991**).

Eine vermehrte Einwirkung von ROS auf ein Gewebe bezeichnet man als oxidativen Stress. Dessen Ursache kann neben einer übermäßigen Bildung von ROS auch ein vermindertes Oxidationsschutzsystem darstellen. So zeigen Studien, dass im Alter und besonders in getrübbten Linsen mit dem Fortschreiten der Kataraktentwicklung der Gehalt an Antioxidantien wie Ascorbat (ASA) und Glutathion (GSH), besonders in ihren reduzierten Formen, zurückgeht. Erniedrigt sind ebenfalls antioxidative Schutzenzyme wie Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-Reduktase und Glutathion-Peroxidase (**Ohrloff und Hockwin, 1984; Garland, 1995**). Reicht die Konzentrationen der Antioxidantien nicht mehr aus oder fallen vermehrt ROS

im Stoffwechsel an, führt dies zu oxidativen Schäden an Linsenprotein, die bereits im Rahmen des normalen Alterns zur Linsentrübung führen können (sogenannte Alterskatarakt).

Zu den durch ROS verursachten Schäden zählen neben der Peroxidation von Lipiden und Strangbrüche der DNA vor allem die Modifikationen von Aminosäuren. Die schwefelhaltigen Aminosäuren Histidin und Tryptophan verlieren ihre Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) durch Oxidation, teilweise durch die Bildung von Disulfidbrücken und anderen nicht-Disulfid-Quervernetzungen (**Bloemendal, 1982**). Tryptophan wird zu farbigen Abbauprodukten oxidiert, von denen bekannt ist, dass sie als Photosensibilisatoren fungieren und bei Lichtexposition in der Lage sind, Sauerstoff photodynamisch zu ROS zu aktivieren (**Augustin et al., 2001; Argirova und Breipohl, 2002**).

Gerade in den letzten Jahren hat sich die Bedeutung eines weiteren Stoffwechselweges gezeigt: die nicht-enzymatische Glykosilierung von Proteinen. Diese spielt nicht nur beim Diabetes mellitus eine Rolle, sondern auch im Rahmen normaler Alterungsvorgänge. Grundsätzliches lassen sich zwei Gruppen an Glykosilierungsprodukten unterscheiden.

Die frühen Glykosilierungsprodukte, sogenannte EGP (early glycation products) entstehen, wenn Glukose mit einer Aminogruppe des Proteins eine Schiff'sche Base bildet, die sich dann in ein etwas stabileres Ketoamin, das Amadori-Addukt, umlagern kann (**Augustin et al., 2001**). Die Konzentration der EGP im Gewebe korreliert mit der Glukosekonzentration des umgebenden Mediums wie Blut oder Kammerwasser und die durch sie ausgelösten Prozesse sind zunächst noch vollständig reversibel.

Amadori-Addukte bilden die Basis für weitere, irreversible Proteinveränderungen. Es entstehen sogenannte Glykosilierungs-Endprodukte (advanced glycation end products oder AGE). AGE können durch Dehydratation, Kondensation und Umlagerung aus Amadori-Addukten entstehen (**Augustin et al., 2001**). Als wichtigstes AGE wurde dabei das Carboxymethyllysine (CML) identifiziert. Generell kennzeichnend für die Akkumulation von AGE ist eine starke Zunahme des Carbonylgruppengehaltes von langlebigen Proteinen (**Garland, 1990**).

Da es sich gezeigt hat, dass die nicht-enzymatische Glykosilierung von Protein und oxidative Prozesse untrennbar miteinander verbunden sind, spricht man auch von „glycooxidation“ (**Baynes, 1991**).

Für die in der Kataraktlinse akkumulierten ROS gibt es verschiedene Quellen:

- Diffusion aus dem umgebenden Kammerwasser (**Spector et al., 1998**)

- Entstehung durch UV-Einwirkung im Linsengewebe (**Zigman et al., 1979; Varma et al., 1984**)
- Stoffwechselvorgänge der Linsenepithelzelle (**Andley et al., 2000**)
- Umbau von EGP in den Linsenfasern durch Autooxidation von Glukose (**Mullarkey et al., 1990; Sakurai und Tsuchiya, 1998**)

In den beiden letztgenannten Fällen sind divalente Metallionen als Katalysatoren an der Entstehung von ROS beteiligt. Auch der Umbau von EGP zu AGE erfordert die Anwesenheit von Metallionen. Von allen divalenten Metallionen, die als Katalysatoren in Frage kommen, liegen Eisen und Kupfer in höchster Konzentration in der Linse vor.

Divalente Metallionen erfüllen im Gesamtorganismus diverse Funktionen. In den reaktiven Zentren von Enzymen lässt sich die Redoxaktivität der Metallionen exakt steuern. Im Hämoglobin sind zweiwertige Eisenionen für den Sauerstofftransport zuständig. Für Transport und Speicherung von Metallen stehen im Blut sowie in den Zellen spezifische Metallbindepoteine wie Transferrin und Ferritin zur Verfügung.

Liegen divalente Metallionen dagegen in ungebundener Form vor, stehen sie für unkontrollierte Redoxreaktionen zur Verfügung und können schwere Schäden durch die Oxidation von Biomolekülen hervorrufen. Studien haben aber gezeigt, dass in vitro durch Komplexierung solcher Metallionen durch Agentien wie Ethylendiamintetraacetat (EDTA) oder Diethylentriaminpentaacetat (DETEPAC) die Proteinalterung und speziell die Kataraktentstehung in Anwesenheit von Glukose weitestgehend unterbleibt.

Somit stellt sich die Frage nach dem Vorhandensein von Eisen- und Kupferionen in der Linse und nach deren Verfügbarkeit für Redoxreaktionen. In vielen Studien wurde gezeigt, dass in Linsen mit Katarakt ein deutlich höherer Eisengehalt und teilweise auch Kupfergehalt nachzuweisen ist als in normalen Linsen (**Garland, 1990; Garner et al., 2000**). Die Metalle liegen größtenteils in gebundener Form vor, zum Beispiel in eisenhaltigen Enzymen und Cytochromen, wie sie in den Linsenepithelzellen vorkommen, oder in unspezifischen und spezifischen metallbindenden Proteinen wie Ferritin. Daten zur exakten Verteilung der Metalle in der Linse sind in der aktuellen Literatur nicht vorzufinden.

Da die Linse ausschließlich über das Kammerwasser ernährt wird, müssen auch die Eisen- und Kupferionen hierher stammen. Im Kammerwasser gesunder menschlicher Augen liegt die Eisen- und Kupferkonzentration in ähnlicher Höhe wie sie auch in den Linsen gefunden wird. Werte für das Kammerwasser von Kataraktpatienten sind in der Literatur nicht zu finden. Die Eisenionen

scheinen für die Entstehung von ROS und den resultierenden oxidativen Stress von größerer Bedeutung zu sein als die der Kupferionen. Zum einen ist ihre Konzentration in der Linse viel höher, zum anderen gibt es Anzeichen dafür, dass Eisenionen in redoxaktiver Form vorliegen, Kupferionen dagegen nicht (**Garner et al., 2000**).

Vor dem geschilderten Hintergrund konzentriert sich die vorliegende Arbeit in erster Linie auf den Nachweis von Eisenionen in der Linse, hierbei insbesondere in unterschiedlichen Regionen der Linse. Zum Nachweis von Eisen bieten sich die Atomabsorptionsspektrometrie, die Massenspektrometrie sowie photometrische Verfahren unter Verwendung von Ferrozine oder Ferrene S an. In dieser Studie wurde der Eisengehalt mit der Ferrene S-Methode gemessen, die als standardisierte Methode vielfach in klinischen Labors zur Bestimmung der Serum-eisenkonzentration eingesetzt wird. Ihre Handhabung ist einfach, und die zu erzielenden Ergebnisse sind zuverlässig (**Seligmann und Schleicher, 1999**).

Durchgeführt wurden alle Versuche an Protein aus Kälberlinsen. Kälberlinsen bieten den Vorteil, dass sie ihrer Größe wegen gut zu handhaben und zu schneiden sind und relativ große Mengen an Protein liefern. Darüber hinaus waren frische Linsen leicht in großer Stückzahl im nächstgelegenen Schlachthof zu bekommen, ohne dafür eigens Versuchstiere töten zu müssen. Menschliche Linsen hingegen sind seit der Einführung der Technik der Phakoemulsifikation in der Staroperation nur schwer und in geringer Stückzahl zu erhalten.

Rinderaugenlinsen dienen in der Wissenschaft oft als Modell für Veränderungen der menschlichen Linse. Es gibt zwar spezifische Unterschiede zwischen beiden, dennoch sind sie in ihrer Anatomie, der Zusammensetzung ihrer Kristalline und im Hinblick auf ihre altersabhängigen Veränderungen vergleichbar (**Bours, 1980; Berg, 1997**).

1.2 Zielsetzung

Auswirkungen oxidativen Stresses auf die in Linsenfasern enthaltenen Kristalline wurden bereits vielfach untersucht. Auf molekularer Ebene identifiziert wurden bisher sowohl die Quellen reaktiver Sauerstoffmetabolite als Übermittler des oxidativen Stresses als auch verschiedene durch sie hervorgerufene Schädigungsmuster an langlebigen Biomolekülen (**Garland, 1990; Obara, 1995; Augustin et al., 2001**).

Von besonderem Interesse für die Kataraktforschung ist die Herkunft und Entstehungsweise der ROS. Sie sind der Schlüssel zur Erforschung jener Umstände, unter denen sich eine Linsentrübung ausbildet.

ROS wie zum Beispiel Superoxidradikale ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxylradikale (OH^{\bullet}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen im Rahmen natürlicher Stoffwechselvorgänge in allen Geweben, durch photodynamische Prozesse im Gefolge von UV-Einstrahlung sowie durch metallabhängige Reaktionen (**Garland, 1990; Wolff et al., 1991; Fu et al., 1998**). Da die Verfügbarkeit von Metallen, in erster Linie Eisen und Kupfer, der entscheidende Faktor für die Entstehung reaktiver Sauerstoffmetabolite zu sein scheint (**Garner, 2000**), konzentriert sich die vorliegende Studie auf den Nachweis dieser Ionen in Kälberlinsen. Besonderes Augenmerk richtet sich auf die Eisenkonzentration in den verschiedenen Regionen der Linse, die sich im Bezug auf Alter, Stoffwechselaktivität und Entfernung zur Linsenoberfläche nachhaltig unterscheiden. Dieser Ansatz ist in der gegenwärtigen Literatur nicht vorzufinden.

Somit ergaben sich folgende Hauptfragen als Zielsetzung:

- 1) Stellen die Altersregionen der jungen Linse ein brauchbares Modell für die Organalterung dar und führt dies zu unterschiedlichen Eisenionengehalt der Kristalline in den einzelnen Regionen?
- 2) In wieweit sind die Amadori-Produkte der frühen Glykosilierung und die irreversiblen Glykosilierungs-Endprodukte als Zeichen oxidativen Stresses nachzuweisen?
- 3) Wie hoch ist die Belastung von Linsenprotein durch oxidativen Stress, gemessen am Verhältnis von oxidiert zu reduziert vorliegenden SH-Gruppen in den einzelnen Teilen der Linse?
- 4) Lassen sich Zusammenhänge zwischen diesen Parametern erkennen?

Um diese Fragen zu klären, wurden folgende Schritte unternommen:

- 1) Kälberlinsen wurden im mittleren Bereich gestanzt. Der Stanzzylinder wurde in 1mm dicke Scheiben geschnitten, um Proben von unterschiedlich altem Protein zu erhalten. Aus dem frischen Linsengewebe jeder Region wurde das wasserlösliche Protein extrahiert und getrocknet.
- 2) Um die Verfügbarkeit von Metallionen in wasserlöslichem Linsenprotein unterschiedlichen Alters zu bestimmen, wurde die Konzentration von Eisenionen und probeweise die Konzentration von Kupferionen gemessen.
- 3) Es wurden Daten ermittelt, um Aussagen zur Belastung der einzelnen Linsenregionen durch oxidativen Stress sowie bereits erfolgte Alterungsprozesse des Proteins zu ermöglichen.

Fruktosamin als Repräsentant der EGP sowie der Carbonylgruppengehalt des Linsenproteins als Hinweis auf die Akkumulation von AGE wurden gemessen. Zudem wurde Redoxstatus der SH-Gruppen bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1 Präparation von bovinen Linsen und Extraktion der Proteine

Zur Materialgewinnung wurden Kälberaugen am Morgen der Schlachtung vom Schlachthof bezogen, während des Transportes durch Eis gekühlt und ohne Verzögerung präpariert, um etwaige Veränderungen der Linsenproteine weitestgehend auszuschließen. Zur Präparation wurde die vordere Augenkammer eröffnet und schließlich die gesamte Hornhaut durch einen kreisförmigen Schnitt entlang des Limbus Corneae mit einer Schere abgehoben. Die Iris wurde am Stück entfernt, die nun freiliegenden Zonulafasern mit dem Skalpell durchtrennt und die Linse entnommen. Verwendet wurden nur Linsen, deren Kapsel unbeschädigt geblieben war.

Die Linsen wurden von pigmentierten Resten der Zonulafasern und der Iris gesäubert, indem sie auf Filterpapier gerollt wurden. Anschließend wurden sie zum Transport mit der vorderen Kapsel nach unten auf Filterpapier platziert, gewogen und für mindestens eine Stunde bei -20°C aufbewahrt. Die tiefgefrorenen Linsen wurden daraufhin nach dem „Bonner Verfahren“ (Hockwin et al., 1986) geschnitten. Vom vorderen bis zum hinteren Kortex wurde ein Zylinder, Durchmesser 6 oder 8 mm, herausgestanzt. Dieser Zylinder wurde je nach Dicke der Linsen in 8 bis 10 Scheiben geschnitten (Abb. 2). Da die Proteinmenge aus einer Region einer einzelnen Linse für die Messungen nicht ausreichte, wurden die entsprechenden Scheiben aus bis zu 46 Linsen gepoolt. Die jeweils korrespondierenden Scheiben mehrerer Linsen wurden in einen Zentrifugierkolben aus Plastik (13ml) gegeben. Zusätzlich wurden Linsenäquatoren, die beim Stanzvorgang übriggeblieben waren, zur Extraktion in Plastikkolben gegeben.

Zu dem so gewonnenen Linsengewebe wurden je nach Art der Aufbereitung einige ml destilliertes (destill.) Wasser, Acetat-Puffer (pH 4,2, 0,4 mol/l) oder einer Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (50 mmol/l) gegeben. Die schlecht löslichen Linsenscheiben wurden mit Hilfe von Ultraschall zerkleinert. Anschließend wurden die Proben in einer Beckmann J-25I-Zentrifuge zentrifugiert, um gelöstes und ungelöstes Protein getrennt. Der Überstand wurde dekantiert und in eine Plastikdose (Mehrzweckgefäß mit Deckel, Inhalt 15 ml, von Greiner, Deutschland) gegeben, das Pellet erneut in den oben genannten Medien gelöst, durch Ultraschall zerkleinert und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden entnommen und mit denen der ersten Extraktion vereinigt. Die so erhaltene Lösung des wasserlöslichen Linsenproteins wurde bei -20°C einige

Stunden tiefgefroren und danach im Vakuum getrocknet. Das gewonnene getrocknete Protein wurde im Gefrierschrank bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Es wurde viermal aus frischen Linsen Protein extrahiert (**Abb. 1**). Da das gewonnene Protein für unterschiedliche Versuche verwendet wurde, unterschieden sich die Extraktionsvorgänge hinsichtlich Anzahl der Linsen, Schneidevorgang und zur Extraktion verwendetem Lösungsmittel.

Abbildung 1: Gewinnung von Linsenprotein und seine Verwendung

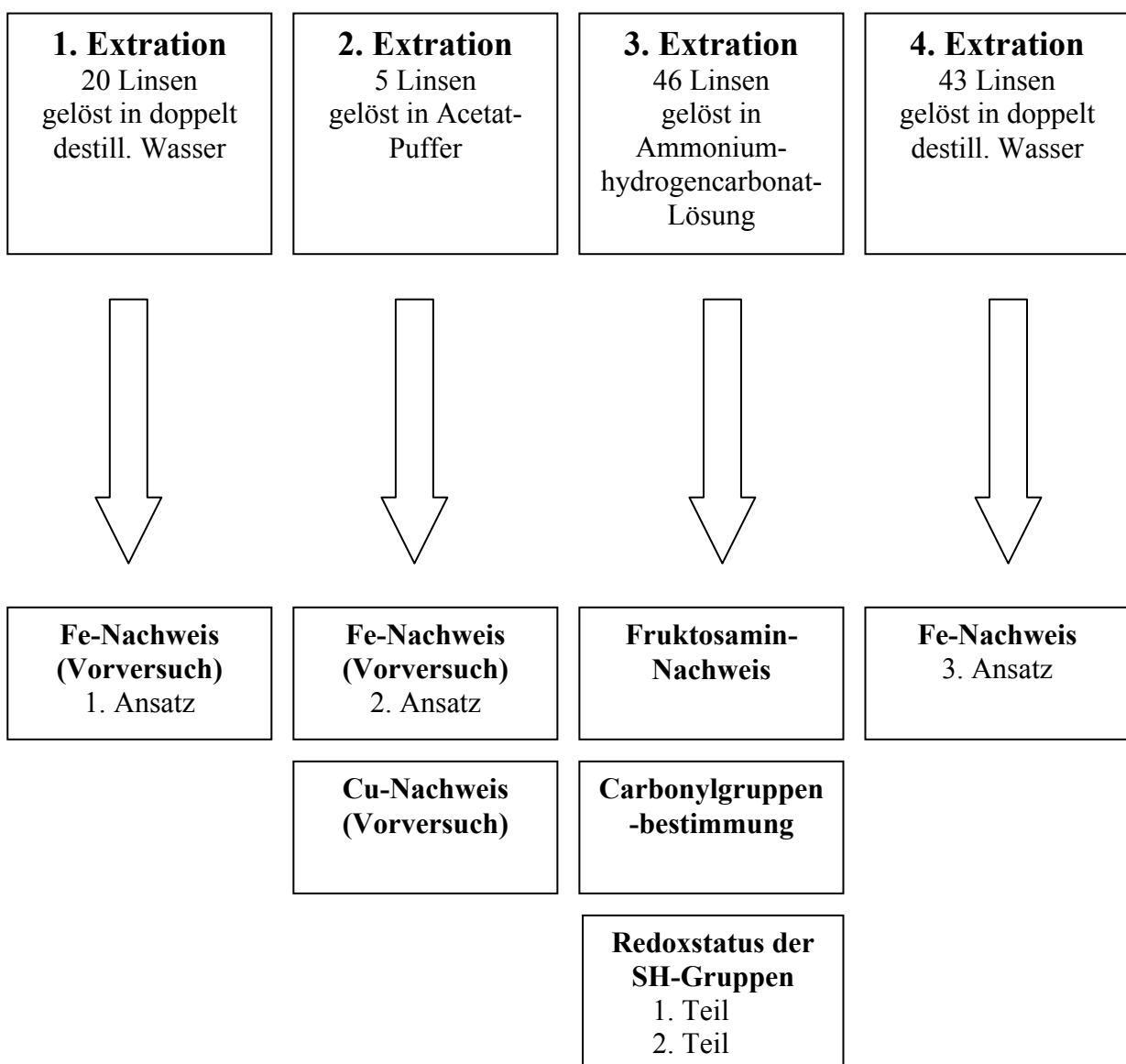
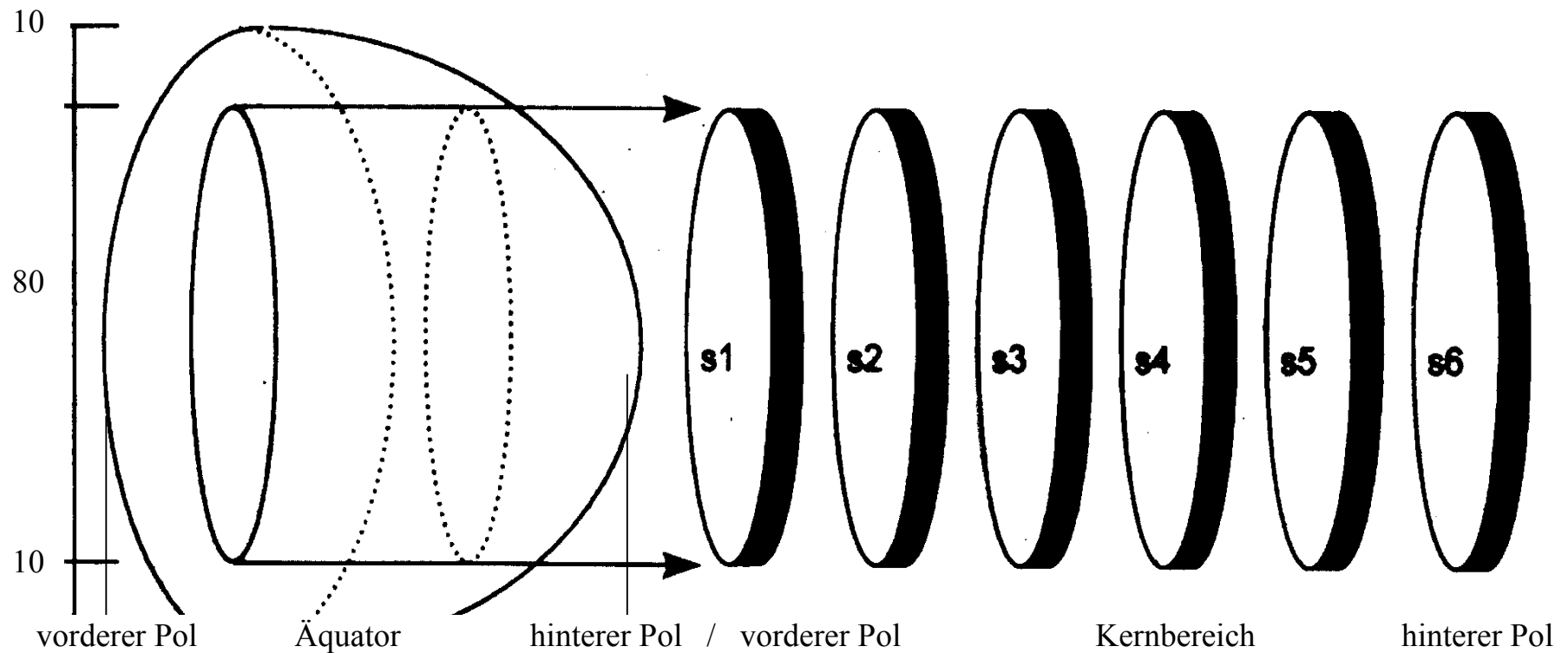


Abbildung 2: Stanzen und Schneiden der Kälberlinsen

Die Kälberlinsen wurden nach dem „Bonner Verfahren“ geschnitten: Ein zentraler Zylinder, der in etwa 80 % des Linsendurchmessers ausmacht, wurde aus einer gefrorenen Linse ausgestanzt und in 8 bis 10 Scheiben (hier nur 6 gezeigt) mit einer Dicke von circa 1mm geschnitten.

Linsendurchmesser in %



1. Extraktion:

Material: 20 Linsen

Stanzzylinderdurchmesser: 6 mm, zu 10 Scheiben mit je 1 mm Dicke geschnitten.

Lösungsmittel: Doppelt destill. Wasser, Proteinscheiben bzw das Pellet in jeweils 7 ml gelöst.

Zentrifugieren: Zwei Durchgänge bei jeweils 32.000g, 4-8°C, im ersten Durchgang 30 min, im zweiten 60 min. Die zwei Überstände wurden vermischt und getrocknet, das Pellet verworfen.

Da die gewonnene Menge Protein der einzelnen Linsenscheiben sehr gering war, wurde das Protein je zweier Schichten gemischt (Schicht 1 mit 2, Schicht 3 mit 4, usw.), so dass größere Mengen Protein aus jetzt nur noch 5 Schichten von je 2 mm Dicke zur Verfügung standen.

2. Extraktion:

Material: 5 Linsen

Die Linsen wurden nicht geschnitten.

Lösungsmittel: 3 ml Acetat- Puffer, 0,2 mol/l, pH 4.5.

Zentrifugieren: Ein Durchgang bei 51.500g, 4-8°C, 30 min. Die Überstände wurden getrocknet.

In diesem Falle wurden die Pellets, welche fast ausschließlich wasserunlösliches Protein enthielten, an der Luft getrocknet und anschließend ebenfalls im Kühlschrank bei -20° C aufbewahrt.

3. Extraktion:

Material: 43 Linsen

Stanzzylinderdurchmesser: 6 mm, zu 8 Scheiben mit je 1 mm Dicke geschnitten.

Lösungsmittel: Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung, 50 mmol/l.

Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung wurde verwendet, weil es für Protein ein besseres Lösungsmittel als doppelt destill. Wasser darstellt.

In drei Durchgängen wurde zentrifugiert (jeweils bei 32.000g, 4-8°C), um die Ausbeute an Protein zu erhöhen. Protein wurde in 5 ml Medium gelöst, 120 min zentrifugiert, 3 ml Überstand zur Proteingewinnung aufbewahrt. Mit 3 ml frischem Medium wurde aufgefüllt, erneut 100 min zentrifugiert. Der gesamten Überstand wurde entfernt, mit 2 ml Medium aufgefüllt und erneut

für 100 min zentrifugiert. Das verbleibende Pellet wurde verworfen, die drei Überstände gemischt und getrocknet.

4. Extraktion:

Material: 46 Linsen.

Stanzzylinderdurchmesser: 8 mm, zu 9 Scheiben mit je 1 mm Dicke geschnitten.

Lösungsmittel: Doppelt destill. Wasser, Proteinscheiben bzw das Pellet in jeweils 7 ml gelöst.

Doppelt destill. Wasser wurde verwendet, um eventuelle Verunreinigung durch Eisenionen, wie sie in Puffern oft in geringen Mengen vorzufinden sind, auszuschliessen.

Wegen der großen Anzahl der Linsen wurden sie in zwei Portionen von je 23 Linsen aufgeteilt, die getrennt verarbeitet wurden. Zum Schluss wurden die extrahierten und getrockneten Proteine der korrespondierenden Schichten beider Portionen gemischt.

Zentrifugieren: 32.000g, 4-8°C, dreimal jeweils 90 min

Alle drei Überstände, die aus der selben Schicht stammten, wurden vermischt, getrocknet und analysiert, das Pellet verworfen.

2.2 Bestimmung des Eisen- und Kupfergehaltes von Protein

2.2.1 Eisenionenbestimmung unter Verwendung von Ferrene S:

Quelle: Seligmann und Schleicher (1999)

Chemikalien:

0,2 M Acetat-Puffer (pH 4,5): 11,44 ml Essigsäure werden in ca. 800 ml doppelt destill. H₂O gegeben, mit 0,1 M NaOH zu pH 4,5 titriert. Mit doppelt destill. Wasser wird bis auf 1000 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur (RT) für maximal einen Monat gelagert.

6 M Guanidin-Hydrochlorid: 57,32 g Guanidin-Hydrochlorid werden in 100 ml Acetat-Puffer (pH 4,5) gelöst, filtriert und in einer Flasche bei RT für maximal einen Monat gelagert.

2 mM Ascorbinsäure-Lösung: 3,52 mg ASA werden in 10 ml Acetat-Puffer gelöst und bei RT für maximal einen Tag aufbewahrt.

Ferrene S-Lösung: 49,5 mg Ferrene S (Molekulargew.: 494,4) werden in 100 ml Acetat-Puffer gelöst.

Prinzip der Messung:

Der Eisengehalt einer Lösung lässt sich unter Verwendung des Ferrene S-Ansatzes photometrisch bestimmen. Hierzu wurde wasserlösliches Linsenprotein in doppelt destill. Wasser oder 0.2 M Acetat-Puffer (pH 4,5) gelöst. Proteingebundene Eisenionen wurden durch Zugabe von 6 M Guanidin-HCl in Acetat-Puffer oder Triochloressigsäure (TCA) 30% vom Protein gelöst. Wasserunlösliches Linsenprotein wurde direkt in 6 M Guanidin-HCl gelöst. Durch Zugabe von 2 mM Ascorbinsäure in Acetat-Puffer wurden vorhandene Fe^{3+} -Ionen zu Fe^{2+} -Ionen reduziert. Daraufhin wurde Ferrene S-Lösung hinzugefügt, die mit freien Fe^{2+} -Ionen einen blauen Komplex bildet, dessen Lichtabsorption bei 595 nm ein Maximum aufweist. Die Absorptionen der Proben wurden jeweils vor und nach Zugabe von Ferrene S sowie Inkubation bei Raumtemperatur in einem Beckmann DU 650-Photometer bei 595 nm gemessen und die Differenzen ermittelt.

1. Ansatz des Fe-Nachweises (Vorversuch):

Material: wasserlösliches (ws) Linsenprotein aus Extraktion 1

Von jeder zu messenden Proben wurden 200 mg in 1 ml 6 M Guanidin-HCl aufgelöst.

Für die Ermittlung der Standardkurve wurden 10 Lösungen FeCl_3 in 6 M Guanidin-HCl mit Konzentrationen von 10 bis 100 $\mu\text{mol/l}$ verwendet. Für den Leerwert des Photometers wurde 6 M Guanidin-HCl benutzt.

Versuchsschema: 0,4 ml Probenlösung + 50 μl Ascorbinsäure in Acetat- Puffer. Die Absorption wurde bei 595 nm im Photometer gemessen, 0,25 ml Ferrene S-Lösung hinzugegeben, gut gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde nach 30 min und erneut nach 24 h photometrisch bestimmt.

Mit Hilfe der Standardkurve wurden die Eisenkonzentrationen in pmol Eisen pro mg trockenem Protein ermittelt. Die in den Diagrammen dargestellten Werte entsprechen den Messungen im Photometer nach 24 h.

2. Ansatz des Fe-Nachweises (Vorversuch):

Material: Wasserlösliches und –unlösliches Linsenprotein aus je 5 Linsen aus Extraktion 2.

Proteinlösungen: Wasserlösliches Protein wurde in doppelt destill. Wasser aufgelöst, wasser-unlösliches Protein (wi) in 6 M Guanidin-HCl. Die Konzentration der Proteinlösung wurde nach der Bradford-Methode gemessen (s.u.). Hierzu wurden 100-fache Verdünnungen (ws) bzw. 50-fache Verdünnungen (wi) der Proteinlösungen in Phosphat-Puffer, pH 6,9, angefertigt.

Versuchsschema: Protein (ws): 0,4 ml Proteinlösung + 0,4 ml 6 M Guanidin-HCl + 0,1 ml 2 mM ASA in Acetat-Puffer wurden gut vermischt. Die Absorption der Lösungen wurden bei 595 nm im Photometer gemessen, 0,1 ml Ferrene S hinzugegeben und gut gemischt. Nach 3 h wurde die Absorption erneut gemessen. Eine Standardkurve wurde nicht ermittelt. Ein Standardwert wurde mit FeCl₃ in Acetat- Puffer (50 µmol/l) nach dem selben Schema gemessen. Als Leerwert wurde Acetat-Puffer verwendet.

Protein (wi): 0,4 ml Proteinlösung + 50 µl ASA in Acetat- Puffer. Es wurde gut gemischt, die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen. 50 µl Ferrene S- Lösung wurden hinzugegeben, erneut gemischt und die Absorption nach 3 h ermittelt. Ebenfalls zur Orientierung wurde eine Probe FeCl₃ in 6 M Guanidin-HCl gemessen. Als Leerwert für das Photometer wurde 6 M Guanidin-HCl benutzt.

Mit Hilfe der Standardwerte wurde die Eisenkonzentration in der Proteinlösung ermittelt. Unter Berücksichtigung der mit der Bradford-Methode gemessenen Werte für die Proteinkonzentration wurde die Eisenkonzentration in pmol pro mg trockenem Protein errechnet.

3. Ansatz des Fe-Nachweises:

Um die Kontaminationsmöglichkeiten durch Eisenionen gering zu halten, wurde bei diesem Versuch zur Verdünnung Puffer durch doppelt destill. Wasser ersetzt. Die verwendeten Zentrifugierkolben aus Plastik wurden über Nacht mit 1 N HCl gefüllt stehen gelassen und gründlich mit doppelt destill. Wasser ausgewaschen.

Material: Linsenprotein (ws) aus Extraktion 4: Proben aus 9 Schichten von je 1 mm Dicke sowie äquatorielles Protein. Eine Kontrollprobe, die zu Beginn nur destill. Wasser enthielt, wurde ebenfalls allen Schritten des Experimentes unterzogen.

390 mg Protein aus Schicht 1 (Die aus dem Stanzzylinder geschnittenen Scheiben wurden vom vorderen (1) bis zum hinteren Pol (9) durchnummeriert), je 400 mg Protein aus den Schichten 2 und 9 sowie 500 mg Protein der Schichten 3 bis 8 und äquatoriellem Protein wurden in je 3 ml doppelt destill. Wasser in den oben erwähnten Zentrifugierkolben aufgelöst.

Das Protein wurde durch Zugabe von 1,5 ml TCA 30 % gefällt. Hierdurch wurden die proteingebundenen Eisenionen abgelöst. Es wurde in der Beckmann J-25I-Zentrifuge bei 32.000g 45 min bei 4° C zentrifugiert. Die Überstände, die den größten Teil der Eisenionen enthielten, wurden in Plastikbehälter (13 ml) gegeben. Die Pellets wurden in 2 ml doppelt destill. Wasser aufgelöst, erneut bei 32.000g für 45 min bei 4° C zentrifugiert und die Überstände zu denen des ersten Durchganges gegeben. Dieser Vorgang wurde noch ein drittes Mal wiederholt und die Pellets dann verworfen.

Die so erhaltenen Lösungen, die den größten Teil der Eisenionen aus dem Protein beinhalteten, wurden bei -70° C in den Plastikbehältern tiefgefroren. Anschließend wurde deren Öffnung mit Parafilm® verschlossen, in die Abdeckung ein kleiner Spalt geschnitten. Die Lösungen wurden im Vakuum über Nacht getrocknet.

Die durch Trocknung der Lösung gewonnenen Salze wurden in den Plastikdosen in 0,5 ml Acetat-Puffer aufgelöst, in 1,5 ml Eppendorf®-Röhrchen transferiert und für 10 min in einer Eppendorf® 5417R Zentrifuge mit 20.000g bei 8°C zentrifugiert. Es entstand eine klare, hoch konzentrierte Salzlösung, deren Eisengehalt mit der Ferrene S-Methode bestimmt wurde.

Dazu wurden 0,4 ml der Salzlösung zusammen mit 50 µl Ascorbinsäure in Acetat Puffer (2 mM), in eine Küvette gegeben und gut gemischt. Die Absorption bei 595nm der Salzlösung wurde als Leerwert photometrisch gemessen. Nach der Zugabe von 50 µl Ferrene S-Lösung wurde nach 1 h und 24 h die Absorption jeder Probe erneut ermittelt. Die Differenz zwischen Leerwert und dem Wert der Absorption nach 24 h wurde genommen, um mit Hilfe einer Standardkurve die Eisenkonzentration der Salzlösung zu errechnen.

Die Standardkurve wurde mit 10 FeCl₃-Lösungen in Acetat-Puffer ausgeführt. Die Konzentration der Lösungen reichte dabei von 5 bis 50 µmol/l. Die Leerprobe für das Photometer bestand aus Acetat-Puffer.

Die Absorption wurde ermittelt aus der Differenz vor und nach Zugabe von Ferrene S, wobei der nach 24 h gemessene Wert als Grundlage diente. Von allen so erhaltenen Werten wurde noch die Absorption abgezogen, die in der Kontrollprobe gemessen wurde. Mit Hilfe der Standardkurve wurde die Eisenkonzentration in der Salzlösung berechnet.

Unter Berücksichtigung der zu Beginn jeweils unterschiedlichen Mengen eingesetzten Proteins konnte die Eisen-Konzentration in pmol/mg trockenem Linsenprotein errechnet werden.

Mit Hilfe der Werte für die Proteinkonzentration im Frischgewebe der einzelnen Linsenregionen, die von **Bours und Ahrend 1992** veröffentlicht wurden, konnte der Eisengehalt im nativen Linsengewebe errechnet werden.

2.2.2 Kupferionenbestimmung unter Verwendung von Bathocuproine disulfonic acid (BCS):

Quelle: Kossman (1983)

Chemikalien:

0,2 M Acetat-Puffer (pH 4,5): 11,44 ml Essigsäure werden in ca. 800 ml doppelt destill. Wasser gegeben, mit 0,1 M NaOH zu pH 4,5 titriert. Mit doppelt destill. Wasser wird bis auf 1000 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur für maximal einen Monat gelagert.

6 M Guanidin-Hydrochlorid: 57,32 g Guanidin-Hydrochlorid werden in 100 ml Acetat-Puffer pH 4,5 gelöst, filtriert und in einer Flasche bei RT maximal 1 Monat gelagert.

2 mM Ascorbinsäure-Lösung: 3,52 mg ASA werden in 10 ml Acetat-Puffer gelöst. Lösung wird maximal einen Tag gelagert

Bathocuproine disulfonic acid-Lösung: 0,1 g BCA werden in 100 ml Acetat-Puffer gelöst.

Prinzip der Messung:

Mit Hilfe der BCS-Methode lässt sich der Kupferionengehalt einer Lösung photometrisch bestimmen. Hierzu wurden wasserlösliches Protein in doppelt destill. Wasser und 6 M Guanidin-HCl, wasserunlösliches Protein nur in Guanidin-HCl gelöst. Guanidin-HCl löst proteingebundene Kupferionen ab. Durch Zugabe von 2 mM Ascorbinsäure in Acetat-Puffer wurden Cu^{2+} zu Cu^{+} -Ionen reduziert. Daraufhin wurde BCS-Lösung hinzugegeben. BCS bildet mit freien Cu^{+} -Ionen einen rötlichen Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 484 nm im Photometer gemessen werden kann.

Material: Wasserlösliches und –unlösliches Linsenprotein aus Extraktion 2.

Proteinlösungen: ws-Protein wurde in zweifach destill. Wasser aufgelöst, wi-Protein in 6 M Guanidin-HCl. Um die Proteinkonzentrationen der Lösungen zu bestimmen, wurden die Lösungen mit Phosphat-Puffer, pH 6,9, verdünnt (100-fache Verdünnungen bei ws-Protein bzw. 50-fache Verdünnungen bei wi-Protein) und mit Hilfe der Bradford-Methode gemessen (s.u.). Der Kupfergehalt der Proteinlösungen wurde nach folgendem Schema gemessen:

Wasserlösliches Protein: 0,4 ml Proteinlösung + 0,4 ml 6 M Guanidin-HCl + 0,1 ml 2 mM ASA in Acetat-Puffer wurden gut vermischt. Die Absorption der Lösungen wurden bei 484 nm im Photometer gemessen, 0,1 ml BCS hinzugegeben und gemischt. Nach 3 h wurde die Absorption erneut gemessen. Eine Standardkurve wurde nicht ermittelt. Zur Orientierung wurde eine Probe CuCl_2 in Acetat- Puffer (50 $\mu\text{mol/l}$) nach dem selben Schema gemessen. Als Leerwert wurde Acetat-Puffer verwendet.

Wasserunlösliches Protein: 0,4 ml Proteinlösung + 50 μl 2 mM ASA in Acetat- Puffer. Es wurde gut gemischt, die Absorption bei 484 nm im Photometer gemessen. 50 μl BCS-Lösung wurden hinzugegeben, erneut gemischt und die Absorption nach 3 h ermittelt. Ebenfalls zur Orientierung wurde eine Probe CuCl_2 in 6 M Guanidin-HCl gemessen. Als Leerwert für das Photometer wurde 6 M Guanidin-HCl benutzt.

Mit Hilfe der Standardwerte wurde die Kupferkonzentration in der Proteinlösung ermittelt. Unter Berücksichtigung der im Bradford-Ansatz gemessenen Werte für die Proteinkonzentration wurde die Kupferkonzentration in pmol pro mg trockenem Protein errechnet.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung nach Bradford:

Quelle: Bradford (1976)

Chemikalien:

Bradford-Lösung: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 werden in 5 ml 95% Ethanol gelöst. 10 ml Ortho-Phosphorsäure werden hinzugegeben und mit doppelt destill. Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wird filtriert und in einer dunklen Flasche bei RT bis zu einer Woche aufbewahrt.

Prinzip der Messung:

Coomassie Brillant Blue Farbstoff formt mit Protein in Lösung blaue Komplexe, die bei 412 nm und 595 nm Absorptionsmaxima aufweisen.

Experimenteller Ablauf: Je 2,5 ml Bradford-Lösung werden in Plastikküvetten gegeben. 50 µl der Probelösung werden hinzugefügt, gut gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wird die Absorption bei 595 nm gemessen.

In diesem Falle wurden die Ausgangsproteinlösungen mit Phosphat-Puffer pH 6,9 verdünnt. Pro Ausgangslösung wurden je 2 Proben gemessen. Für die Standardkurve wurde Linsenprotein in Phosphat-Puffer gelöst mit Konzentrationen von 0,1 bis 1 mg/ml. Als Leerwert fungierte Phosphat-Puffer.

Mit Hilfe der Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen der Ausgangslösungen errechnet, wobei deren Verdünnung berücksichtigt wurde. Aus den je 2 Proben wurde der Mittelwert der Ergebnisse genommen.

2.3 Bestimmung des Fruktosamingehaltes von Protein mit Hilfe von Nitrotetrazolblau-Chlorid (NBT):

Quelle: Mullarkey et al. (1990)

Chemikalien:

Carbonat-Puffer: 0,1 M Natriumcarbonatlösung: 1,06 g Na_2CO_3 werden in 100 ml doppelt destill. Wasser gelöst. 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung: 0,42 g NaHCO_3 werden in 50 ml doppelt destill. Wasser gelöst.

75 ml Na_2CO_3 -Lösung werden mit NaHCO_3 -Lösung (etwa 25 ml) zu einem pH von 10,35 titriert. Der Puffer enthält zusätzlich 100 μmol EDTA, um die Bildung von Radikalen durch redoxaktive Metallionen-Katalysatoren zu verhindern.

0,25 mM NBT-Lösung: 20 mg Nitrotetarzolblau-Chlorid werden in 100 ml Carbonat-Puffer gelöst und gefiltert.

Prinzip der Messung:

An Proteinen entstehen im Rahmen der frühen Glykosilierung Amadori-Produkte. Sie sind in der Lage, NBT zu reduzieren. NBT in reduzierter Form lässt sich photometrisch bestimmen. Es besitzt ein Absorptionsmaximum bei 530 nm.

Die Rate der NBT-Reduktion wurde bestimmt über die Differenz der Absorption (ΔA_{530}) über einem Zeitintervall von 15 min. Nach der Methode von **Mullarkey et al. (1990)** lassen sich keine absoluten Werte des Fruktosamingehaltes/g Protein ermitteln, sondern nur verschiedene Proben miteinander vergleichen. Der höchste in einer Probe gemessene Wert ΔA_{530} wurde als 100% definiert und die Werte aller anderen Proben hierzu in Relation gesetzt.

Material: Wasserlösliches Linsenprotein aus Extraktion 3, Proben aus 8 Schichten von je 1 mm sowie äquatorielles Protein.

Experimenteller Ablauf:

In 1,5 ml Eppendorf[®]-Behältern wurden je 10 mg Protein in 1 ml Carbonat-Puffer gelöst. 2 mal 0,3 ml hiervon wurden in je eine Plastikküvette gegeben. 0,7 ml 0,25 mM NBT-Lösung wurden hinzugefügt und gut vermischt. Die Absorption der Proben wurden zu Beginn und nach 15 min bei 530 nm im Photometer gemessen. Als Leerwert wurde Carbonat-Puffer verwendet.

ΔA_{530} wurde für jede Probe ermittelt. Von den je zwei Proben pro Ausgangslösung wurde der Mittelwert genommen.

2.4 Messung des Gehaltes an Carbonylgruppen von Protein

2.4.1 Messung der Hydrazonkonzentration mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH):

Quelle: Reznik und Packer (1994)

Chemikalien:

25 mM DNPH: 0,0495 g 2,4 Dinitrophenylhydrazin werden in 10 ml 2,5 M HCl gelöst.

20% Triochloressigsäure (TCA): 2g CCl₃COOH werden in 5 ml doppelt destill. Wasser gelöst.

Ethanol und Ethylacetat werden im Verhältnis 1:1 gemischt.

6 M Guanidin-Hydrochlorid: 57.32 g werden in 100 ml doppelt destill. Wasser gelöst.

Prinzip der Messung:

Bei Inkubation von Protein mit DNPH formt dieses einen Komplex mit den Carbonylgruppen des Proteins in Form von Hydrazonen. Diese Komplexe besitzen ein Absorptionsmaximum bei 370 nm, das photometrisch gemessen wurde. Da die natürliche Absorption des Proteins bei 370 nm sehr hoch ist, wurden Kontrollen ohne DNPH allen weiteren Schritten unterzogen und ebenfalls bei 370 nm gemessen. Die so ermittelten Ergebnisse wurden von denen der mit DNPH behandelten Proben abgezogen. Die Konzentration der Hydrazone ergab sich aus der Gleichung: $C_{(\text{Hydrazone})} = A_{370} \times 45,45 \text{ (nmol/ml)}$ (**Reznik und Packer, 1994**).

Unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmenge wurde die Carbonylgruppenkonzentration in nmol pro mg Protein angegeben.

Material:

wasserlösliches Linsenprotein aus Extraktion 3, stammend aus 8 Schichten von je 1 mm sowie äquatorielles Protein.

Experimenteller Ablauf:

Je 20 mg Linsenprotein wurden in 2 ml Eppendorf[®]-Gefäßen in 2 ml 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4, gelöst. Aus jeder Ausgangslösung wurden 4 Proben angefertigt: 2 zur Behandlung mit DNPH, 2 zur Kontrolle. Dazu wurden je 0,5 ml Proteinlösung in 1,5 ml Eppendorf[®]-Gefäße pipettiert. In jeweils 2 Proben wurden 0,2 ml DNPH in HCl gegeben, in die beiden anderen 0,2 ml 2,5 M HCl. Alle Proben wurden bei RT im Dunklen für 1 h inkubiert, dabei gelegentlich durchgemischt. Darauf hin wurde je 0,7 ml 20% TCA hinzugegeben, um das Protein auszufällen.

Es wurde in bei 20.000g und 4°C 15 min in einer Eppendorf®-5417R Zentrifuge das Protein abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Um freies DNPH aus dem Protein zu entfernen, wurde es mit Ethanol-Acetat gewaschen. 1 ml Ethanol-Acetat wurde hinzugegeben, gemischt, erneut für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen. Diese Prozedur wurde noch 3 mal wiederholt, bis die gelbe Farbe des DNPH völlig aus dem Überstand verschwunden war. Die Proteinpellets wurden für 24 h an der Luft getrocknet und daraufhin ihr Gewicht bestimmt. Dann wurde zu jeder trockenen Probe 0,5 ml 6 M Guanidin-HCL gegeben, gemischt und für 24 h inkubiert, bis das Protein komplett gelöst war. Die Lösungen wurden in Quarzküvetten transferiert und ihre Absorption bei 370 nm gemessen.

Die Proteinkonzentration dieser Lösung wurde auf zweierlei Wegen bestimmt. Zum einen wurde die Proteinkonzentration errechnet aus dem Volumen an Guanidin-HCL und aus dem Trockengewicht des Pellets. Zum anderen wurden die Proben 10-fach in Natriumphosphat-Puffer verdünnt und die Proteinkonzentration mit der BCA-Methode (s.u.) gemessen.

Von allen Proben wurden Duplikate angefertigt und die Mittelwerte berechnet. Die Hydrazonkonzentration wurde mit Formel $C_{(\text{Hydrazone})} = A_{370} \times 45,45 \text{ (nmol/ml)}$ (**Reznik und Packer, 1994**) berechnet.

2.4.2 Messung der Proteinkonzentration einer Lösung mit Bichinonsäure (BCA):

Quelle: Smith et al. (1985)

Chemikalien:

Lösung A: 1% Bichinonsäure als Dinatriumsalz (BCA- Na_2), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,16% Na_2 -Tatrat, 0,4% NaOH, 0,9% NaHCO_3 . pH mit 50% NaOH auf 11,25 eingestellt, bei RT aufbewahrt.

Lösung B: 4% $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in deionisiertem Wasser, bei RT aufbewahrt.

Arbeitslösung: Lösung A + Lösung B im Mischungsverhältnis 50:1

Prinzip der Messung:

BCA bildet mit Protein in Lösung einen intensiv blauen Komplex, dessen Absorption bei 562 nm gemessen wurde. Die Proteinproben wurden 2 h bei RT mit BCA inkubiert. Da die Entwicklung der Absorption auch nach langer Zeit keinen Endwert erreicht, müssen alle Proben inklusive Standardreihe innerhalb kurzer Zeit gemessen werden (10 min). Als Leerwert wurde Lösungs-

medium statt Proteinlösung eingesetzt. Ihre Absorption bei 562 nm wurde von allen Werten der anderen Proben abgezogen. Mit Hilfe der Standardreihe wurden die Proteinkonzentrationen der Lösungen errechnet.

Experimenteller Ablauf:

1 ml Arbeitslösung wurden in eine Platikküvette gegeben. Nach Zugabe von 50 µl Proteinlösung wurde gut gemischt. Nach 2 h wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Für die Standardkurve wurde Linsenprotein in 6 M Guanidin-HCl aufgelöst in Konzentrationen von 0,1 bis 1 mg/ml. Destill. Wasser fungierte als Photometer-Leerwert.

2.5 Messung von Sulfhydrylgruppen in Protein vor und nach Reduktion

Quelle: Jahngen-Hodge et al. (1994)

Chemikalien:

100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,9): 17,79 g Natriumhydrogenphosphat werden in 1 l doppelt destill. Wasser gelöst und mit H₃PO₄ auf pH 6,9 titriert.

100 mM Tris-HCL-Puffer (pH 8,2) mit 2 mM EDTA: 1,211 g Tris Base und 58,5 mg EDTA werden in 80 ml doppelt destill. Wasser gelöst. Mit 2 M HCl wird auf pH 8,2 titriert und mit doppelt destill. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

10 mM Dithionitrobenzolsäure (DTNB): 19,8 mg DTNB werden in 5 ml Tris-HCl Puffer gelöst

10 mM Glutathion: 6,15 mg Glutathion werden in 2 ml HCl-Puffer gelöst. Standardreihe wird nach Verdünnungsschema erstellt.

Sulfosalicylsäure 25% (SSA)

Natriumborhydrid: 250 mM in 0,1 M NaOH gelöst.

Prinzip der Messung:

Diese Messung wurde durchgeführt, um den Gehalt an reduzierten und oxidierten SH-Gruppengehalt in wasserlöslichem Linsenprotein zu bestimmen. Dabei ist die Methode unter alleiniger Verwendung von DTNB in der Lage, alle SH-Gruppen in reduziertem Zustand zu messen (Teil 1). Im 2 Teil der Messung wurde zunächst durch Zugabe von 250 mM Natriumborhydrid alle vorhandenen SH-Gruppen, sofern sie in oxidiertem Zustand vorlagen, reduziert und

daraufhin mit DTNB gemessen. Auf diese Weise ließ sich der Gesamtgehalt an Sulfhydrylgruppen bestimmen. Freie Aminosäuren wurden vor Zugabe von DTNB mit Hilfe von 25%iger Sulfosalicylsäure aus der Lösung entfernt.

DTNB formt mit SH-Gruppen einen Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 412 nm im Photometer gemessen wurde.

Eine Kontrolle ohne Protein wurde parallel zu allen Schritten des Versuches angefertigt. Die Absorption dieser Kontrolle diente als Leerwert. Von der Absorption aller zu untersuchender Proteinproben wurde dieser Leerwert abgezogen.

Die Standardkurve wurde erstellt mit 10 Lösungen, die GSH in Konzentrationen von 50 bis 500 $\mu\text{mol/l}$ enthielten. Mit ihrer Hilfe wurde die Konzentration der SH-Gruppen der zu untersuchenden Proben errechnet.

Die Proteinkonzentrationen der im Photometer gemessenen Lösungen wurden wie folgt ermittelt. In Teil 1 aus der eingesetzten Proteinmenge und dem Lösungsmittelvolumen, im 2. Teil mit Hilfe der BCA-Methode (s.o.).

Somit waren Protein- und SH-Gruppengehalt der Lösungen bekannt. Aus ihnen wurde der SH-Gruppengehalt in nmol pro mg Protein-Trockengewicht errechnet.

1. Teil: Messung der reduziert vorliegenden SH-Gruppen

Material: Das wasserlösliches Linsenprotein aus Extraktion 3 stammte aus 8 Schichten von je 1 mm Dicke sowie äquatoriellem Protein.

Experimenteller Ablauf: Von jeder Proteinprobe wurden in 1,5 ml Eppendorf[®]-Gefäßen exakt 10 mg in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer gelöst. Um freie Aminosäuren aus der Lösung zu entfernen, wurde jede Probe durch Zugabe von 0,2 ml 25% SSA präzipitiert und in einer Eppendorf[®] 5417R-Zentrifuge 10 min bei 20.000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde in 1 ml 25 % SSA gelöst und erneut zentrifugiert. Diese Prozedur wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Das so gewaschene Proteinpellet wurde in 4 ml 6 M Guanidin in Tris-HCl, pH 8,2 gelöst. Zu 0,2 ml hiervon wurden 0,75 ml Tris-Puffer und 50 μl DTNB gegeben gut gemischt und bei 412 nm die Absorption gemessen. Von jeder Probe wurden Duplikate angefertigt und der Mittelwert beider Absorptionen zur weiteren Berechnung herangezogen.

Für die Standardkurve wurden GSH in Konzentrationen von 50 μM /l bis 500 μM /l in Tris-Puffer gelöst und nach dem selben Schema gemessen.

Als Photometerleerwert fungierte Tris-Puffer.

2. Teil: Messung des Gesamtgehaltes an SH-Gruppen

Material: Das wasserlösliches Linsenprotein aus Extraktion 3 stammte aus 8 Schichten von je 1mm Dicke sowie äquatoriellem Protein.

Experimenteller Ablauf: Etwa je 10 mg Protein wurden in Zentrifugierkolben gegeben und in 1 ml 250 mM Natriumborhydrid gelöst und 1 h bei RT inkubiert und anschließend in 1,5 ml Eppendorf®-Gefäße überführt. Die freien Aminosäuren wurden entfernt durch die Präzipitation des Proteins mit 25% SSA. Die Proben wurden 10 min bei 20.000g und 4°C in einer Eppendorf® 5417R-Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde in 1 ml 25 % SSA gelöst und erneut zentrifugiert. Diese Prozedur wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Das so gewaschene Proteinpellet wurde in 4 ml 6 M Guanidin in Tris-HCl, pH 8,2 gelöst. Zu 0,2 ml hiervon wurden 0,75 ml Tris-Puffer und 50 μl DTNB gegeben, gut gemischt und bei 412 nm die Absorption gemessen. Von jeder Probe wurden Duplikate angefertigt und der Mittelwert beider Absorptionen zur weiteren Berechnung herangezogen.

Für die Standardkurve wurde Glutathion in Konzentrationen von 50 μM /l bis 500 μM /l in Tris-Puffer gelöst und nach dem selben Schema gemessen.

Die Proteinkonzentrationen der Meßlösungen wurden ermittelt unter Verwendung der BCA-Methode (s.o.): hierzu wurden die Lösungen 10-fach in 0,1 M Natriumphosphatpuffer verdünnt.

3. Ergebnisse

Die im Rahmen der einzelnen Versuchsreihen photometrisch für unterschiedliche Linsenregionen ermittelten Daten sollen im folgenden tabellarisch und in Diagrammform dargestellt werden. Zusätzlich werden alle weiteren Beobachtungen erwähnt, die relevant sind für das Zustandekommen und die Gültigkeit der Ergebnisse. Ermittelt wurden Eisengehalt, aus einer Probe auch der Kupfergehalt des Proteins sowie Modifikationen der Aminosäuren, die als Resultat oxidativen Stresses gelten. Dabei interessierte sowohl die absolute Höhe der gemessenen Parameter als auch die relativen Verteilung in den verschiedenen Linsenregionen.

Bei allen Versuchen ergaben sich signifikante Unterschiede der gemessenen Parameter zwischen den unterschiedlichen Teilen der Linse, die im Folgenden spezifisch dargestellt werden.

Eisenionenbestimmung:

Im 1. Ansatz wurde der Eisenionengehalt von Linsenprotein aus Extraktion 1 ermittelt. Da die gewonnene Menge Protein der einzelnen Linsenscheiben sehr gering war, wurde das Protein je zweier Schichten gemischt (Schicht 1 mit 2, Schicht 3 mit 4, usw.) und gemeinsam analysiert. Verwendet wurde die Ferrene S-Methode. Weil der Eisengehalt in Protein sehr gering ist, wurde in einer hochkonzentrierten Proteinlösung (200 mg/ml) gemessen, um eine möglichst hohe Absorption im Photometer zu erhalten. Die Eisenkonzentration wurde mit Hilfe einer Standardkurve berechnet (**Abb. 3, Tab. 1**). Die hierzu eingesetzten Lösungen FeCl_3 -Lösungen hatten Konzentrationen von 10 bis 100 $\mu\text{mol/l}$. Es ergab sich eine lineare Standardkurve für den angegebenen Konzentrationsbereich. Die Korrelation der einzelnen Werte betrug 0,9993. Für nachfolgende Versuche mit der Ferrene S-Methode wurden jeweils eigene Standardkurven angefertigt, um veränderten Versuchsbedingungen Rechnung zu tragen. Als Standards wurde FeCl_3 jeweils im selben Medium gelöst wie das Linsenprotein (6 M Guanidin-HCl, 0.2 M Acetat-Puffer oder doppelt destill. Wasser). Die zu den FeCl_3 -Lösungen und Proteinlösungen hinzugefügte Menge an Ferrene S-Lösung wurde von Versuch zu Versuch mit dem Ziel variiert, immer ausreichend Ferrene S-Moleküle zur Verfügung zu haben und alle in der Probelösung vorhandenen Eisenionen zu komplexieren .

Abbildung 3: Standardkurve Ferrene S-Methode: FeCl_3 in 6 M Guanidin-HCl gelöst. Die Standardkurve diente zur Berechnung des Eisengehaltes von Lösungen, die nach der Ferrene S-Methode durchgeführt wurden. (Fe-Bestimmung Ansatz 1, 2, und 3, siehe **Tab. 4**, **Abb. 4 und 6**)

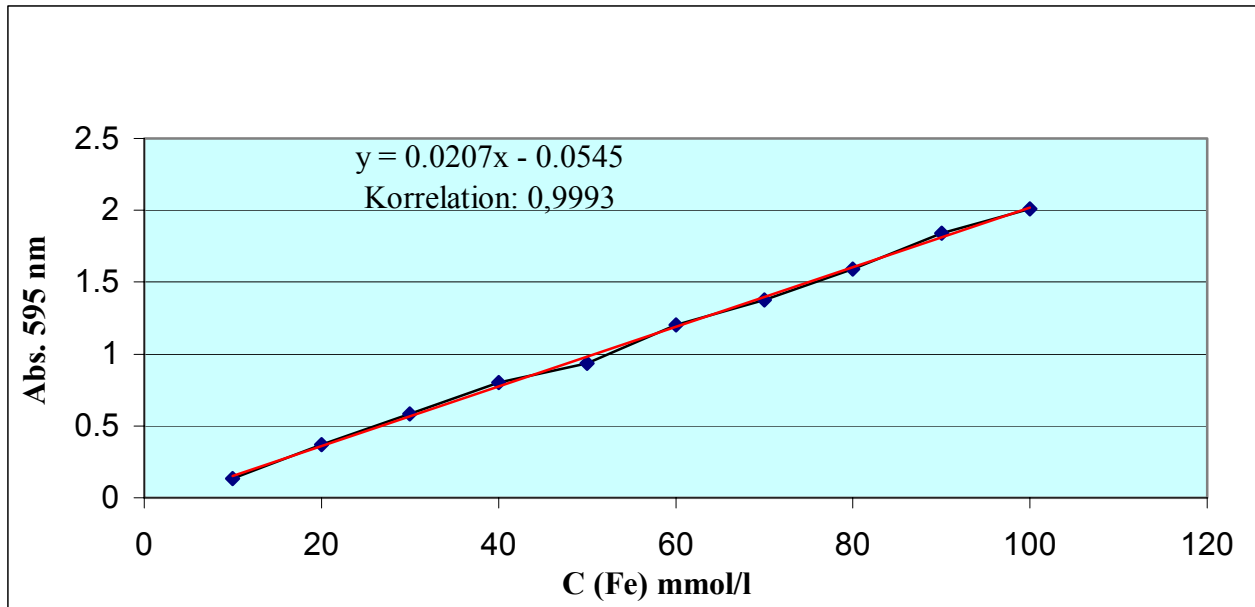
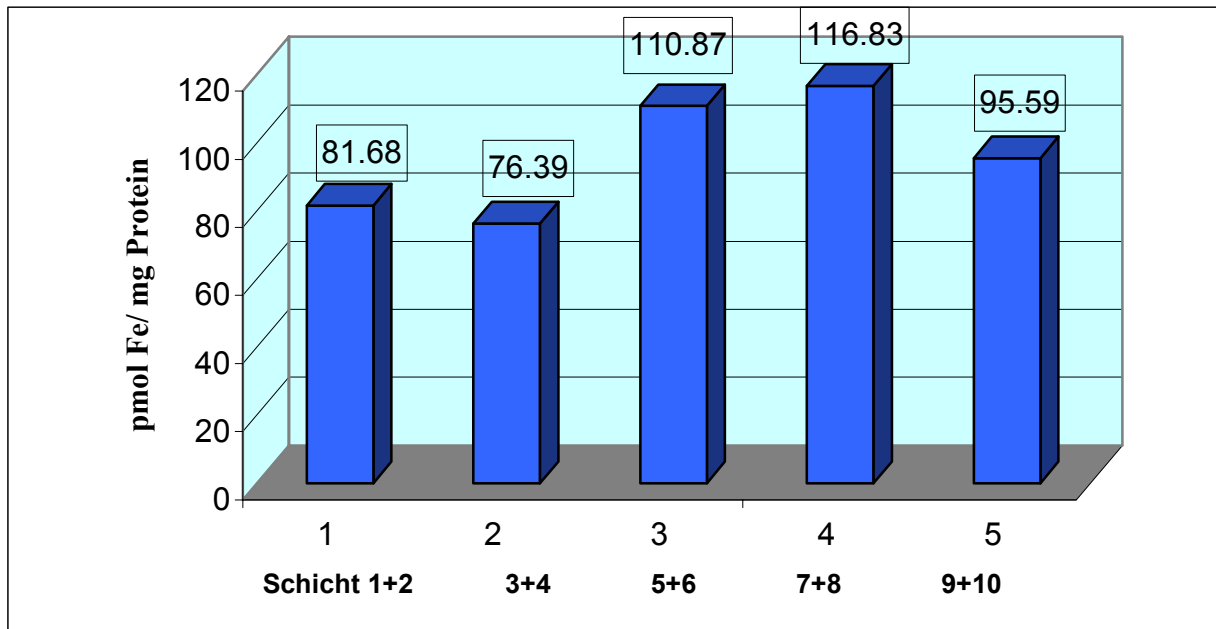


Tabelle1: Standardkurve Ferrene S-Methode: FeCl_3 in 6 M Guanidin-HCl gelöst. Die Standardkurve diente zur Berechnung des Eisengehaltes von Lösungen, die nach der Ferrene S-Methode durchgeführt wurden. (Fe-Bestimmung Ansatz 1, 2, und 3, siehe **Tab. 4**, **Abb. 4 und 6**)

C (Fe) mmol/l	A. 595 nm
10	0,136
20	0,368
30	0,584
40	0,802
50	0,937
60	1,204
70	1,379
80	1,590
90	1,839
100	2,008

Abbildung 4: Vorversuch zur Eisenverteilung in ws Protein: (Ansatz 1, Ferrene S-Methode). Jede Säule repräsentiert je 2 Schichten a 1 mm Dicke von der vorderen (1+2) bis zur hinteren Rinde (9+10). (Ergebnisse wurden ersetzt durch die zuverlässigeren Daten aus **Abb. 6.**)



Nach der Berechnung der Eisenkonzentrationen zeigte sich folgendes Bild: Die höchste Konzentration von Eisenionen wurde im Kernbereich gefunden, genauer gesagt, in den Schichten 7+8 mit 116,8 pmol Fe/mg Protein. Die Eisenionen waren in den äußeren Schichten deutlich geringer, am geringsten in den Schichten 3+4 mit 76,4 pmol/mg. Somit hatten die Schichten 3+4 nur 65,4% des Eisengehaltes der Schichten 7+8 (**Abb. 4**).

Es bildete sich, wahrscheinlich durch die hohe Proteinkonzentration der Lösung, sehr schnell nach Zugabe von Ferrene S-Lösung ein Gel in der Küvette. Dieses Gel mag die Entwicklung der Ferrene S-Eisenkomplexe behindert haben. Zumindest war ein Durchmischen der Proben vor der Photometermessung nicht möglich. Auch eventuell vorhandene Luftbläschen ließen sich nicht aus dem Gel entfernen. Diese Tatsachen ließen die Ergebnisse des Experimentes fraglich erscheinen, so dass weitere Messungen mit modifizierten Methoden nötig wurden.

Im **2. Ansatz** der Ferrene S- Methode wurde Eisen in ws und wi Protein bestimmt. Der 2. Ansatz diente dazu, die Ferrene S-Methode erneut auf ihre Durchführbarkeit zu testen. Als Material diente Linsenprotein aus Extraktion 2. Mit Hilfe der Bradford-Methode wurden die Proteinkonzentrationen der Lösungen ermittelt. Die Standardkurve wurde hierfür erstellt mit Linsen-

protein in Phosphatpuffer. Verwendet wurden 10 Standardlösungen mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 1 mg Protein/ml. Für die Bradford-Methode ergab sich eine lineare Standardkurve (**Abb. 5, Tab. 2**). Die zur Eisenbestimmung verwendeten Proteinlösungen wurden 100-fach verdünnt und wiesen Proteinkonzentrationen zwischen 61,7 und 85,9 mg/ml (ws) und 11,4 bis 17,8 mg/ml (wi) auf.

Für ws Protein lagen die Werte zwischen 278 (Linse 4) und 829 pmol Fe/mg Linsenprotein (Linse 5). Die wi Proteine erreichten lediglich eine Konzentration von 115 (Linse 4) bis 218 pmol Fe/mg Protein (Linse 2, **Tab. 3**). Die Absorptionswerte dieser Probelösungen waren, unter anderem auch durch die geringere Proteinkonzentration, im Ferrene S-Test sehr gering. Sie lagen zwischen 0,028 und 0,062 und waren somit zu niedrig, um verlässliche Ergebnisse zu liefern. Das selbe Material wurden gleichzeitig auch auf Kupferionen untersucht (s.u.).

Es kam nach Zugabe von Ferrene S erneut zur Gelbildung in den Küvetten, obwohl die Proteinkonzentration deutlich niedriger lag als in Ansatz 1. Diese Tatsache und die beträchtliche Streuung der Ergebnisse ließen die Vorgehensweise wenig zuverlässig erscheinen. Auch eine versuchsweise durchgeführte Wiederholung mit Dithiotreitol (DTT) als Ersatz für ASA konnte die Gelbildung nicht verhindern.

Abbildung 5: Standardkurve für Messung des Proteingehaltes einer Lösung nach Bradford. Ws Linsenprotein in Phosphat-Puffer. Die Standardkurve diente zur Errechnung von Proteinkonzentrationen im Rahmen der Messungen mit der Ferren S-Methode und der BCS-Methode (**siehe Tab. 3**).

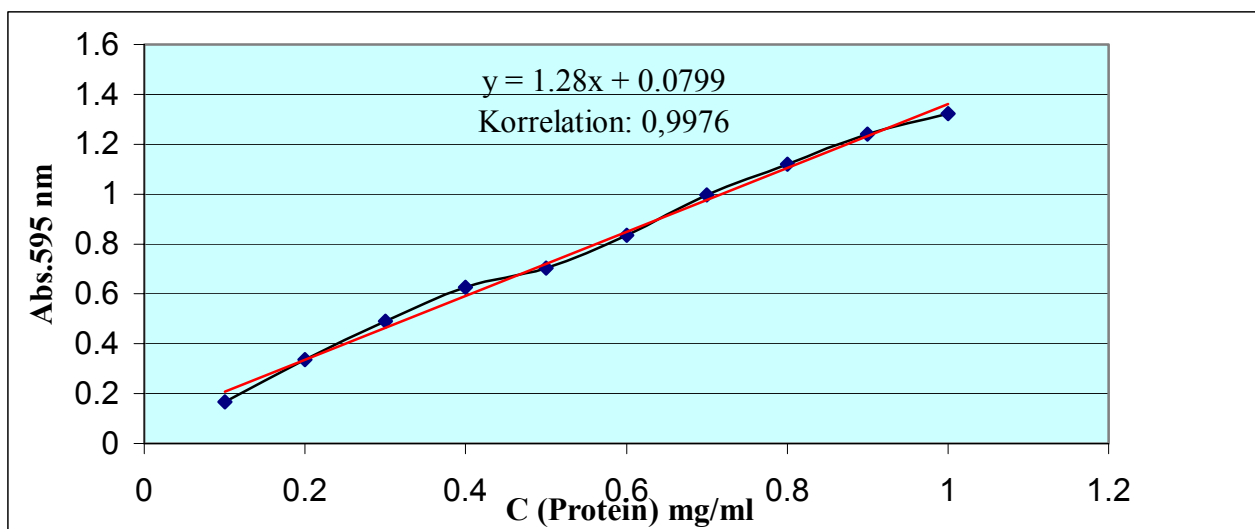


Tabelle 2: Standardkurve für Messung des Proteingehaltes einer Lösung nach Bradford. Ws Linsenprotein in Phosphat-Puffer. Die Standardkurve diente zur Errechnung von Proteinkonzentrationen im Rahmen der Messungen mit der Ferren S-Methode und der BCS-Methode (siehe **Tab. 3**).

C (Prot.) mg/ml	Abs. 595 nm
0,1	0,166
0,2	0,337
0,3	0,492
0,4	0,627
0,5	0,703
0,6	0,835
0,7	0,995
0,8	1,120
0,9	1,241
1,0	1,323

Tabelle 3: Vorversuche: Ansatz 2 der Ferrene S-Methode und des Kupfernachweises mit BCS sowie Proteinkonzentrationen nach Bradford. Die Ergebnisse des Eisen- und Kupfernachweises sind nicht zuverlässig wegen Gelbildung im Reaktionsgefäß.

Linse Nr.	C (Prot.) mg/ml	C (Fe) pmol/mg	C (Cu) pmol/mg	Verhältnis Fe/Cu
1 (wi)	11,84	181	112	1,62
2 (wi)	17,88	218	141	1,55
3 (wi)	12,20	179	108	1,66
4 (wi)	17,76	115	85	1,35
5 (wi)	11,45	152	144	1,06
1 (ws)	75,18	440	977	0,45
2 (ws)	85,94	344	507	0,68
3 (ws)	68,42	707	1487	0,48
4 (ws)	84,93	278	625	0,44
5 (ws)	61,71	829	1567	0,53

Im 3. Ansatz wurde die Ferrene S-Methode modifiziert, um Gelbildung im Reaktionsgefäß zu verhindern. Die Eisenionen wurden vom Protein abgelöst und das Protein darauf aus der Lösung entfernt. Die Lösung wurde konzentriert und mit der Ferrene S-Methode Eisenionen nachgewiesen (Kapitel 2, S. 19). Als Material diente wasserlösliches Linsenprotein aus Extraktion 4.

Während in Ansatz 1 Eisen in höher Konzentration im Kern der Linse nachgewiesen wurde, zeigten die Ergebnisse von Ansatz 3 ein anderes Bild der Eisenverteilung (**Abb. 6, Tab. 4**). Die höchste Eisenkonzentration wurde in den äußeren Bereichen der Linse gemessen, der Kern dagegen war relativ arm an Eisen. Genauer gesagt: die höchste Konzentration von Eisenionen war in Schicht 9 enthalten, die die hintere Rinde repräsentiert. Sie betrug 26,9 pmol Fe/mg Protein und war somit wesentlich geringer, als die vorhergehenden Versuche vermuten ließen. Danach folgte Schicht 2, die mit 22,5 pmol Fe/mg Protein noch 83,6% des Eisengehaltes von Schicht 9 aufweist. Interessanterweise war der Eisengehalt von Schicht 1, die zur vorderen Rinde gehört und ebenfalls die Linsenepithelzellen beinhaltet, mit 17,1 pmol Fe/ mg Protein nur 63% des Wertes von Schicht 9.

Der Eisengehalt fällt von Schicht 2 bis 4 auf seinen tiefsten Stand von 11,6 pmol Fe/mg Protein (43%), um dann bis Schicht 9 permanent anzusteigen. Das ebenfalls gemessene äquatorielle Protein enthielt sehr wenig Eisen (11,9 pmol Fe/mg Protein bzw. 44%). Diese eindeutigen Unterschiede in der Verteilung von Eisen in verschiedenen Linsenregionen bilden die Grundlage der späteren Diskussion.

Um die Eisenkonzentration in frischem Linsengewebe zu berechnen, wurden die Werte für die Proteinkonzentration im Gewebe der einzelnen Linsenregionen zugrunde gelegt, die **Bours und Ahrend 1992** veröffentlicht hatten (**Tab. 4**). Es zeigte sich, dass die höchsten Eisenkonzentrationen im Frischgewebe der Schichten 2 (7,34 pmol Fe/ mg Gewebe) und 9 (6,86 pmol Fe/mg Gewebe) zu erwarten sind. Die geringsten Werte wurden für äquatorielles Gewebe berechnet (2,93 pmol Fe/mg Gewebe).

Kupferionenbestimmung:

Nach dem Muster der Eisenbestimmung in Ansatz 2 wurden auch versuchsweise Messungen von Kupferionen an wasserlöslichem und –unlöslichem Protein durchgeführt. Das Ergebnis sah wie folgt aus. In Lösungen aus wasserlöslichem Protein wurden Werte zwischen 507 pmol Cu/mg Protein (Linse 2) und 1567 pmol/mg (Linse 5) ermittelt. In wasserunlöslichem Protein waren die gemessenen Werte deutlich geringer und reichten von 85 pmol Cu/mg Protein (Linse 4) bis 144 pmol/mg (Linse 5, **Tab. 3**).

Die großen Schwankungen der Ergebnisse zwischen den einzelnen Linsen sowie die Tatsache, dass in Proteinlösung gemessen wurde, lassen die Ergebnisse fraglich erscheinen. Auch in diesem Falle wurde eine Gelbildung in der Küvette beobachtet.

Abbildung 6: Eisengehalt in ws Linsenprotein (pmol/mg). Die Säulen 1 bis 9 repräsentieren je eine Schicht von 1 mm Dicke vom vorderen (1) bis hinteren (9) Linsenpol. Säule 10 zeigt den Eisengehalt von äquatoriellem Protein. (Standardkurve siehe **Abb. 3**)

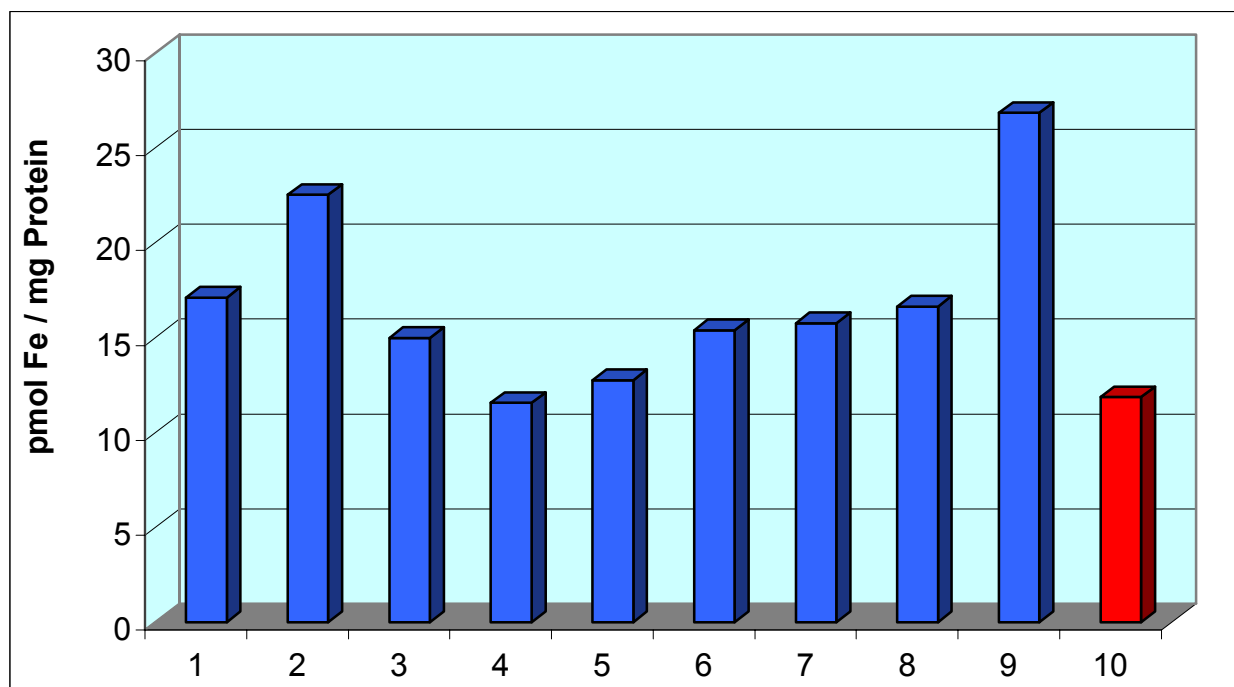


Abbildung 7: Eisengehalt in Linsenfrischgewebe (pmol/mg). Die Säulen 1 bis 9 repräsentieren je eine Schicht von 1 mm Dicke vom vorderen (1) bis hinteren (9) Linsenpol. Säule 10 zeigt den Eisengehalt von äquatoriellem Gewebe (siehe **Tab. 4, Bours und Ahrend, 1992**).

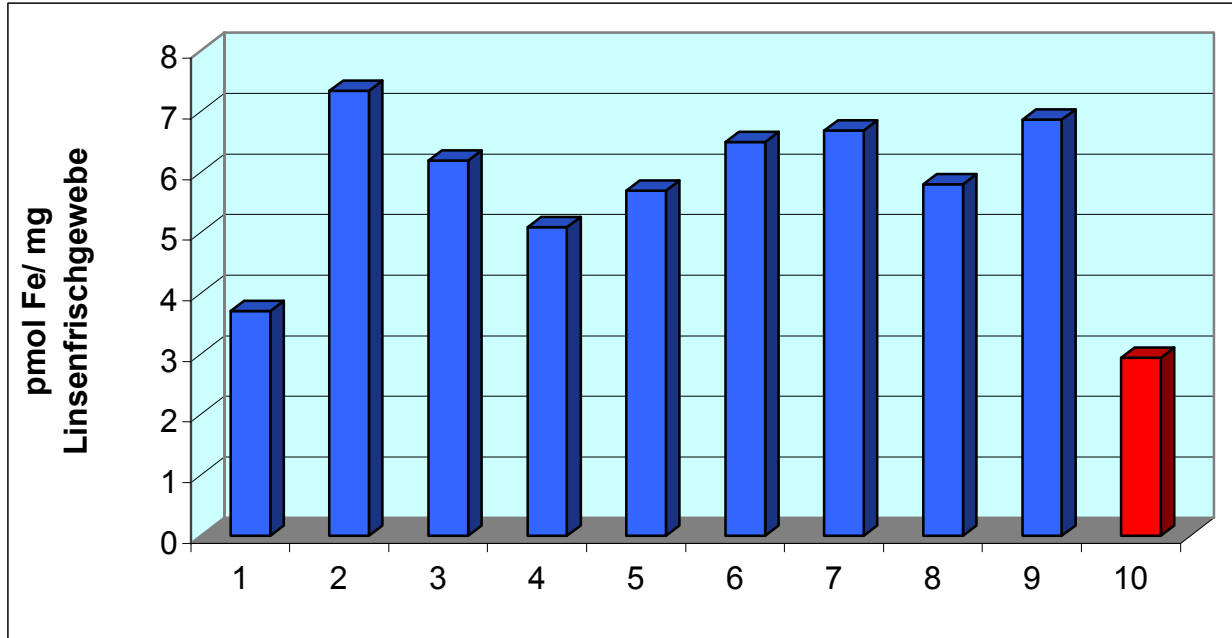


Tabelle 4: Eisengehalt vs Linsenprotein und Linsenfrischgewebe. Die Proben 1 bis 9 repräsentieren je eine Schicht von 1 mm Dicke vom vorderen (1) bis hinteren (9) Linsenpol, sowie äquatorielles Gewebe. (Werte für C (Protein) aus **Bours und Ahrend, 1992**)

Probe/ Schicht	C (Fe) pmol/ mg Protein	C (Protein) in Linsenfrischgewebe in %	C (Fe) pmol/mg Linsenfrischgewebe
1	17,11	21,63	3,70
2	22,52	32,60	7,34
3	14,98	41,30	6,19
4	11,55	44,10	5,09
5	12,76	44,50	5,69
6	15,39	42,20	6,49
7	15,75	42,45	6,68
8	16,63	34,85	5,80
9	26,85	25,55	6,86
Äquator	11,85	24,70	2,93

Fruktosamingehalt:

Mit Hilfe des NBT-Testes wurde der Gehalt an Fruktosamin als Zeichen früher Glykosilierung in wasserlöslichem Linsenprotein bestimmt. Von besonderem Interesse war der unterschiedliche Gehalt in verschiedenen Regionen der Linse.

Nach der Methode von **Mullarkey et al. (1990)** lassen sich keine absoluten Werte des Fruktosamingehaltes/g Protein ermitteln, sondern nur verschiedene Proben miteinander vergleichen. Der höchste in einer Region gemessene Gehalt wurde als 100% festgelegt und alle anderen hierzu in Relation gesetzt. Dabei zeigte sich folgendes Ergebnis. Die höchsten Werte wurden für die Äquatorregion ermittelt. Deutlich niedriger fielen die Ergebnisse für das Protein aus dem gestanzten Zylinder aus. Sie lagen für die Schichten 1 sowie 3 bis 8 zwischen 57,3% und 66,6 % des Gehaltes von Äquatorprotein. Schicht 2 fiel auf durch den niedrigsten Fruktosamingehalt aller Regionen, nämlich 42,4 % (**Abb. 8, Tab. 5**)

Carbonylgruppengehalt:

In diese Meßreihe wurde in extrahiertem Linsenprotein verschiedener Linsenregionen Carbonylgruppen nachgewiesen, wie sie als Produkte der irreversiblen Glykosilierung (AGE) vorkommen. Dabei wurden folgende Beobachtungen gemacht:

Die Absorption der mit DNPH behandelten Proben war bei der Wellenlänge von 370 nm nicht sehr hoch. Sie betrug zwischen 0,15 und 0,23.

Die Absorption der Kontrollproben war deutlich geringer. Die nicht mit DNPH behandelten Proben wiesen Werte auf, die in etwa 20% der Werte der behandelten Proben entsprachen. Sie wurden von den Ergebnissen der behandelten Proben abgezogen.

Die getrockneten Proteinpellets wurden, um später die Konzentrationen der Proteinlösungen zu bestimmen, gewogen. Die damit kalkulierten Konzentrationen lagen zwischen 8,86 mg und 17,42 mg/ml Proteinlösung. Es fiel auf, dass die Proteinpellets der Kontrollproben allesamt deutlich schwerer waren als die der behandelten Proben.

Zur Kontrolle wurden die Proteinkonzentrationen der Probenlösungen mit der BCA-Methode bestimmt. Die Standardkurve wurde ermittelt mit Hilfe von 10 Lösungen von Linsenprotein. Für den Bereich von 0,1 bis 1 mg/ml ergab sich eine lineare Kurve (**Abb. 9**). Die ermittelten

Abbildung 8: Relativer Fruktosamingehalt von ws Linsenprotein. Die Säulen 1 bis 9 repräsentieren je eine Schicht von 1 mm Dicke vom vorderen (1) bis hinteren (8) Linsenpol. Säule 9 steht für äquatorielles Protein. Angaben in % des höchsten der Werte (Nr.9 =100%).

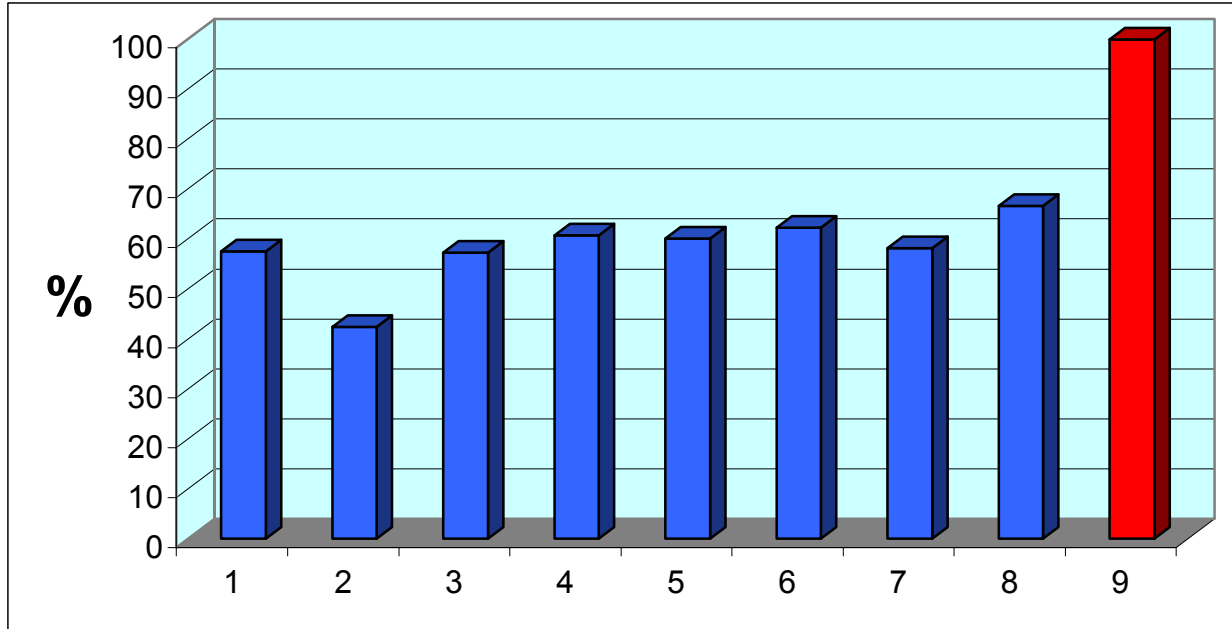


Tabelle 5: Relativer Fruktosamingehalt von ws Linsenprotein. Die Proben 1 bis 9 repräsentieren je eine Schicht von 1 mm Dicke vom vorderen (1) bis hinteren (8) Linsenpol. Probe 9 steht für äquatorielles Protein. Angaben in % des höchsten der Werte (Nr.9 =100%).

Probe/ Schicht	Gehalt % Fruktosamin
1	57,57
2	42,43
3	57,29
4	60,76
5	60,15
6	62,33
7	58,24
8	66,63
Äquator	100

Konzentrationen der Probelösungen waren trotz 10-facher Verdünnung höher als die der Standardlösungen. Sie betrugen zwischen 10,65 und 14,38 mg/ml. In diesem Falle gab es keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Proben.

Da je Probe zwei Angaben zur Proteinkonzentration vorlagen, ergaben sich für den Carbonylgruppengehalt der Linsenproteine unterschiedliche Ergebnisse, je nachdem, welche Methode zugrundelegt wurde (**Tab 6, Tab. 7**).

Greift man auf die Ergebnisse zurück, die sich durch die Verwendung der BCA-Methode ergeben, erhält man folgendes Ergebnis. Die Carbonylgruppenkonzentration der Proteinproben lag zwischen 0,43 und 0,6 nmol/mg Protein. Eine eindeutige Tendenz in der Verteilung ließ sich nicht ausmachen. Auffällig waren Schichten 2 und 6 mit den höchsten Werten. Die Schichten 3 und 1 enthielten dagegen am wenigsten Carbonylgruppen (**Abb. 10**).

Ein vergleichsweise ähnliches Bild ergibt sich, wenn man die Ergebnisse zugrundelegt, die durch Gewichtsmessung der trockenen Proteinpellets zustandekamen. Der Carbonylgruppengehalt schwankte zwischen 0,64 (Schicht 8) und (0,83 Schicht 2) nmol/mgProtein (**Abb. 11**).

Abbildung 9: Standardkurve für Messung des Proteingehaltes einer Lösung nach der BCA-Methode: Linsenprotein in Guanidin-HCL. Die Standardkurve wurde verwendet, um die Proteinkonzentration im Rahmen der Carbonylgruppenbestimmung zu errechnen (**Tab. 6**).

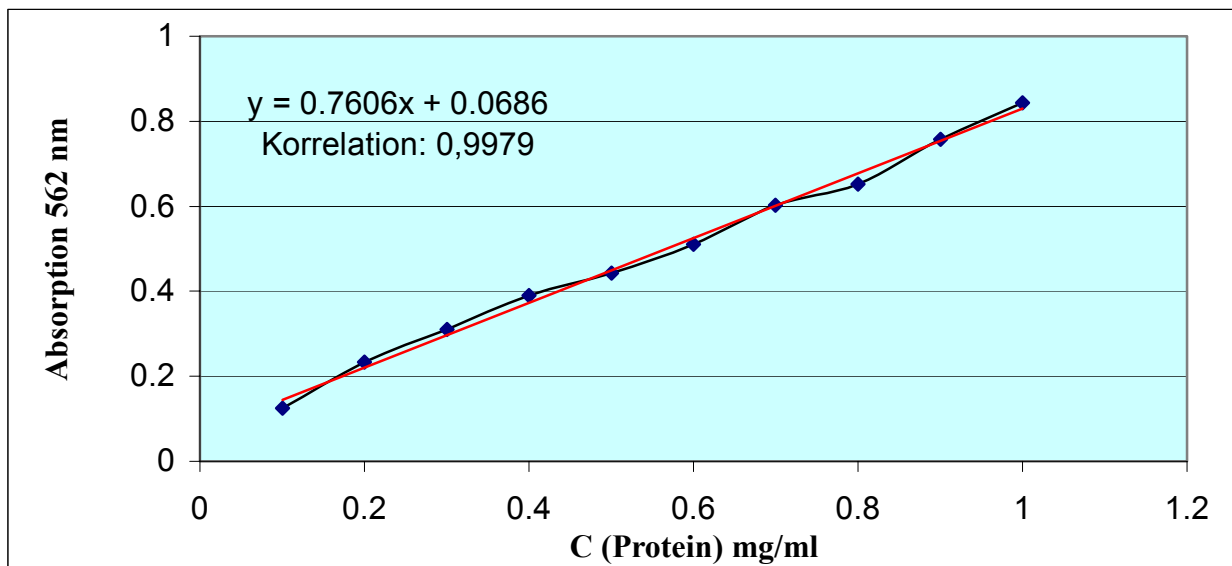


Tabelle 6: Carbonylgruppenbestimmung, basierend auf Proteinkonzentrationsbestimmung der Messlösung mit der BCA-Methode.

Probe/ Schicht	C (Prot.) der Meßlösung in mg/ml	ΔA_{370}	$\Delta A_{370}/$ mg Prot./ ml Lösung	Mittelwert $\Delta A_{370}/$ mg Prot.	Abweichung v. Mittelwert in %	C (Carbonyl- gruppen) nmol/ mg Protein
1	11,88	0,1231	0,0104	0,0101	3,47	0.443
	14,38	0,1394	0,0097			
2	12,76	0,1425	0,0112	0,0131	14,12	0.586
	12,80	0,1904	0,0149			
3	13,97	0,1174	0,0084	0,0100	16,00	0.434
	13,38	0,1555	0,0116			
4	13,58	0,1215	0,0089	0,0110	19,09	0.497
	13,26	0,1742	0,0131			
5	13,74	0,1247	0,0091	0,0109	16,06	0.481
	13,63	0,1713	0,0126			
6	12,85	0,1659	0,0129	0,0133	3,00	0.807
	13,39	0,1833	0,0137			
7	12,68	0,1957	0,0154	0,0129	19,77	0.698
	13,25	0,1037	0,0103			
8	11,67	0,1190	0,0102	0,0097	5,15	0.639
	11,96	0,1096	0,0092			
Äquator	12,89	0,1389	0,0108	0,0115	6,09	0.656
	13,04	0,1595	0,0122			

Abbildung 10: Carbonylgruppengehalt von ws Protein, basierend auf Proteinkonzentrationsbestimmung der Lösung mit der BCA-Methode. Die Säulen 1 bis 8 repräsentieren je eine Schicht von 1 mm Dicke vom vorderen (1) bis hinteren (8) Pol. Säule 9 steht für äquatorielles Protein.

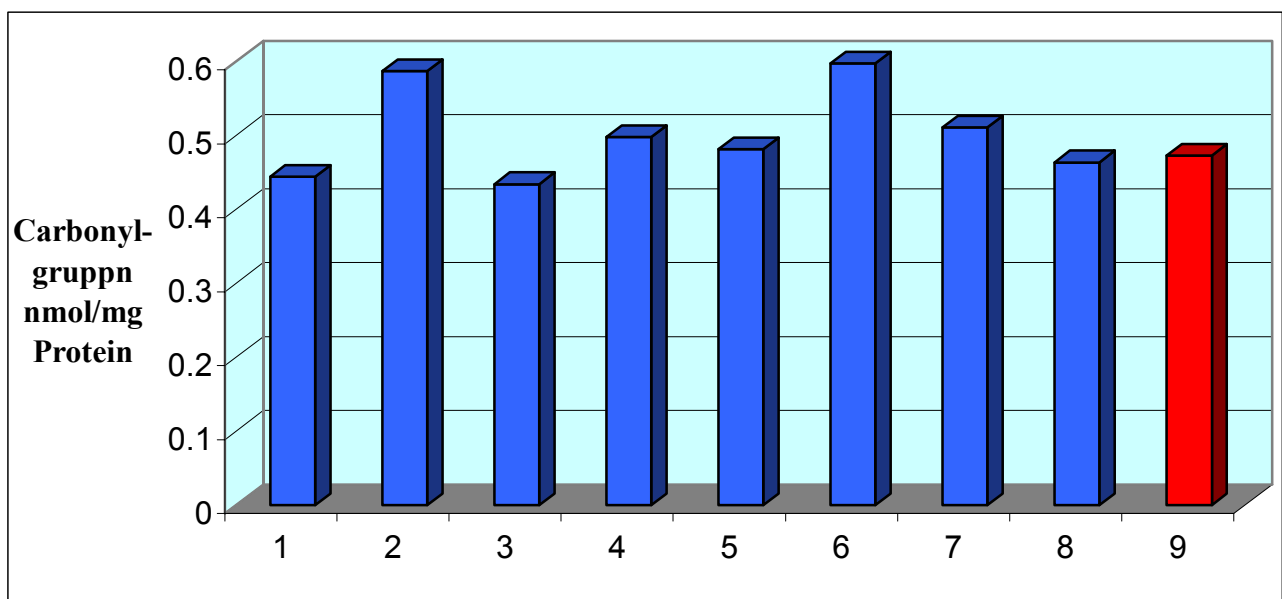
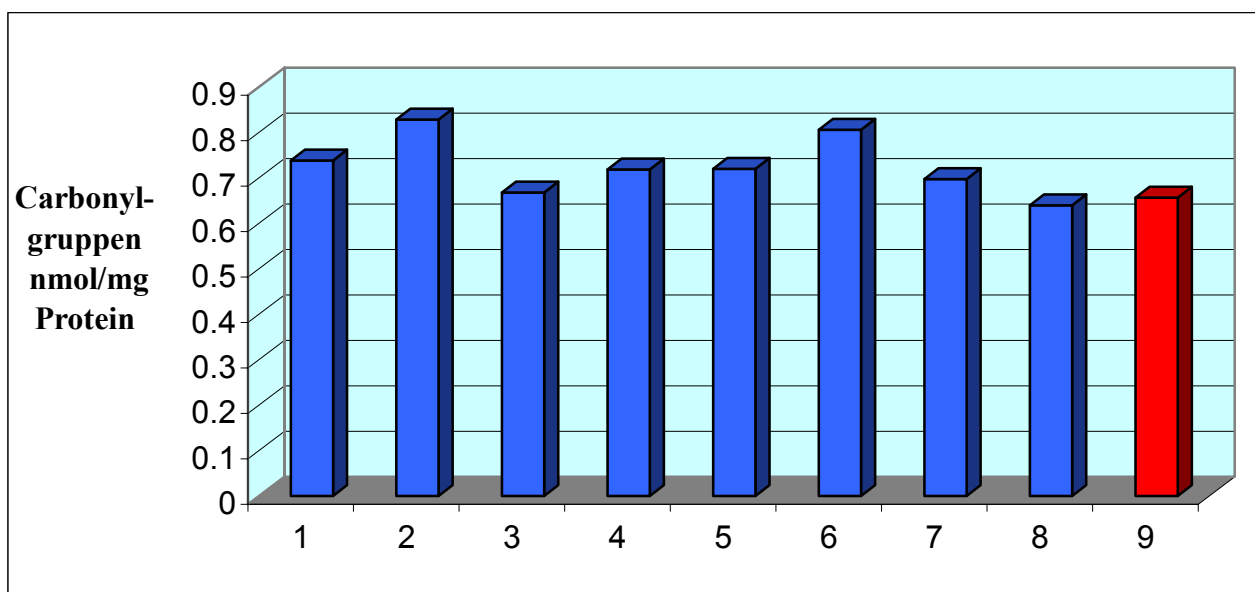


Tabelle 7: Carbonylgruppenbestimmung, basierend auf Proteinkonzentrationsbestimmung der Messlösung durch Abwiegen des Proteins.

Probe/ Schicht	C (Prot.) der Meßlösung in mg/ml	ΔA_{370}	$\Delta A_{370}/$ mg Prot./ ml Lösung	Mittelwert $\Delta A_{370}/$ mg Prot.	Abweichung v. Mittelwert in %	C (Carbonyl- gruppen) nmol/ mg Protein
1	8,86	0,1231	0,0139	0,0147	5,44	0,739
	9,02	0,1394	0,0155			
2	9,58	0,1425	0,0149	0,0171	13,12	0,829
	9,80	0,1904	0,0194			
3	10,14	0,1174	0,0116	0,0134	13,11	0,668
	10,32	0,1555	0,0151			
4	10,16	0,1215	0,0120	0,0140	13,98	0,718
	10,94	0,1742	0,0159			
5	10,12	0,1247	0,0123	0,0142	13,38	0,721
	10,64	0,1713	0,0161			
6	10,26	0,1659	0,0162	0,0168	3,28	0,807
	10,58	0,1833	0,0173			
7	10,22	0,1957	0,0191	0,0142	34,98	0,698
	11,22	0,1037	0,0092			
8	9,44	0,1190	0,0126	0,0119	2,52	0,639
	9,76	0,1096	0,0112			
Äquator	9,86	0,1389	0,0141	0,0149	5,05	0,656
	10,24	0,1595	0,0156			

Abbildung 11: Carbonylgruppengehalt von ws Linsenprotein, Proteinkonzentration errechnet nach Abwiegen der Proteinmenge. Die Säulen 1 bis 8 repräsentieren je eine Schicht von 1 mm Dicke vom vorderen (1) bis hinteren (8) Pol. Säule 9 steht für äquatorielles Protein.



SH-Gruppenbestimmung:

In diesem Versuch wurde der Gehalt von SH-Gruppen in wasserlöslichem Linsenprotein bestimmt. Mit Hilfe der von **Jahngen-Hodge et al. (1994)** beschriebenen Methode ist es möglich, zwischen SH-Gruppen in reduzierter und oxidierten Form zu unterscheiden.

Der Versuch untergliederte sich in zwei Teile. Im 1. Teil wurde die Konzentration der SH-Gruppen gemessen, die bereits in reduzierten Zustand vorlagen, im 2. Teil der Gesamtgehalt an SH-Gruppen. Material war jeweils wasserlösliches Linsenprotein aus verschiedenen Linsenregionen. Aus den Differenzen der in den Teilen 1 und 2 ermittelten Werte wurde der Gehalt an oxidierten SH-Gruppen errechnet. Als Standardkurve für die Messreihe fungierte Glutathion in Tris-Puffer (**Abb. 12**).

In Teil 1 ergab sich folgendes Verteilungsmuster: Der Gehalt der reduziert vorliegenden SH-Gruppen war im Linsenkern am höchsten. Der höchste Wert wurde für Schicht 4 mit 164 nmol/mg Protein gemessen. Zu den Rindenregionen fielen die Werte deutlich ab: zum hinteren Pol bis auf 87 nmol/mg (Schicht 8), zum vorderen Pol hin bis auf 68,7 nmol/mg (Schicht 2). Schicht 1 wies dann einen leicht erhöhten Wert mit 82,9 nmol/mg auf. Die Messung an äquatoriellem Protein ergab einen Wert von 95 nmol/mg (**Tab. 8, Abb. 13**).

In Ansatz 2 zeigte sich ein ähnliches Bild für den Gesamtgehalt SH-Gruppen an, lediglich auf höherem Niveau: Die höchsten Werte wurden wiederum für die Kernregion (225,3 nmol/mg für Schicht 3) ermittelt. Sie fielen bis zur vorderen Rinde bis auf 132,4 nmol/mg und bis zur hinteren Rinde bis auf 109,8 nmol/mg ab. Auch die Äquatorregion war relativ arm an SH-Gruppen (120 nmol/mg).

Aus diesen Werten konnte der Gehalt an ursprünglich oxidierten SH-Gruppen errechnet sowie der prozentuale Anteil der reduzierten Gruppen am Gesamtgehalt ermittelt werden. Es ergab sich folgendes Bild. Der Gesamtgehalt stieg von 62,6% in Schicht 1 (vorderer Kortex) unregelmäßig bis auf 78,4% in Schicht 8 (hinterer Linsenkortex). Nur Schicht 2 fiel auf durch einen deutlich erniedrigten Wert von 38,2 % reduziert vorliegender SH-Gruppen. Äquatorielles Protein wies mit 78% einen ähnlich hohen Wert auf wie der hintere Linsenpol. (**Abb. 14**).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei allen untersuchten Parametern deutliche Unterschiede in den verschiedenen Linsenregionen gefunden wurden. Die Tatsache, dass es sich beim untersuchten Material um Protein aus einer Vielzahl gleich alter Linsen handelt, soll die Zuverlässigkeit der ermittelten Daten unterstreichen. Im folgenden sollen diese Ergebnisse erörtert und mit bereits bestehenden Daten über oxidative Veränderungen in Linsen verglichen werden.

Abbildung 12: Standardkurve für den Nachweis von SH-Gruppen in ws Linsenprotein. Glutathion in Tris-Puffer. Grundlage der Berechnung der SH-Gruppenkonzentration für Tab. 8.

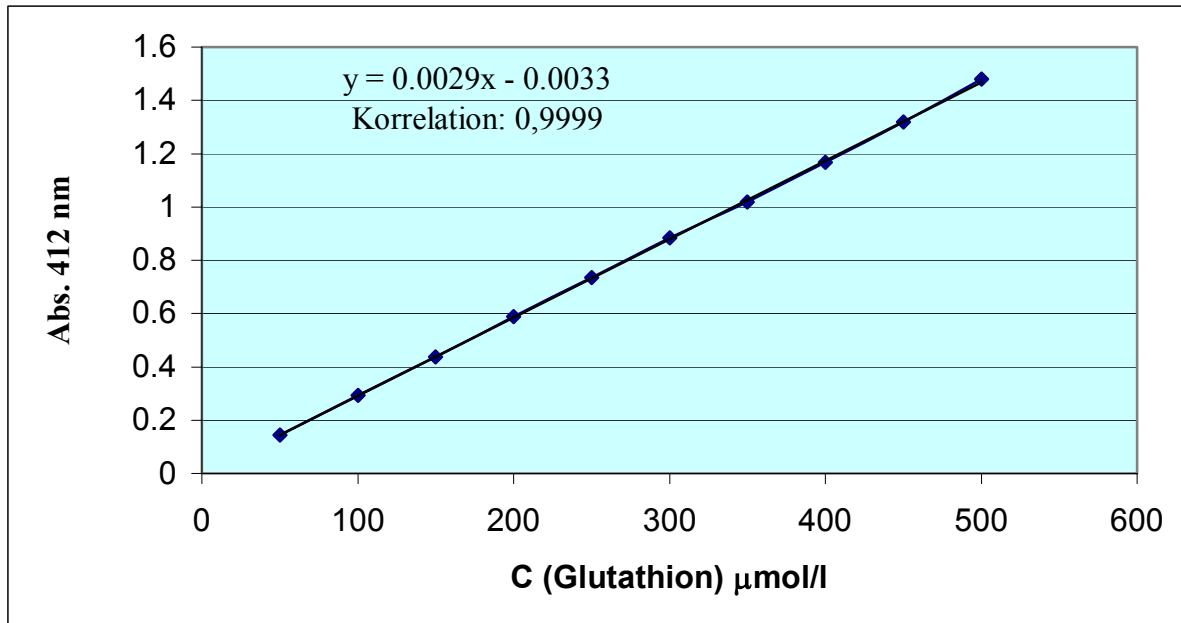


Tabelle 8: SH-Gruppen in wasserlöslichem Linsenprotein:
Reduziert vorliegende SH-Gruppen und Gesamtgehalt SH-Gruppen

Probe/Schicht	SH-Gruppen nmol/mg Protein		
	reduziert vorliegend	Gesamtgehalt	red. vorl. in % v. Gesamtgehalt
1	82,86	132,36	62,6
2	68,67	179,73	38,2
3	125,37	225,29	55,6
4	163,98	224,56	73
5	146,07	220,92	66,1
6	130,27	177,29	73,5
7	109,7	166,66	65,8
8	86,09	109,79	78,4
Äquator	95,22	120,89	78,8

Abbildung 13: SH-Gruppengehalt in ws Linsenprotein. Die Säulen 1 bis 8 repräsentieren je eine Schicht von 1 mm Dicke vom vorderen (1) bis hinteren (8) Pol. Säule 9 steht für äquatorielles Protein.

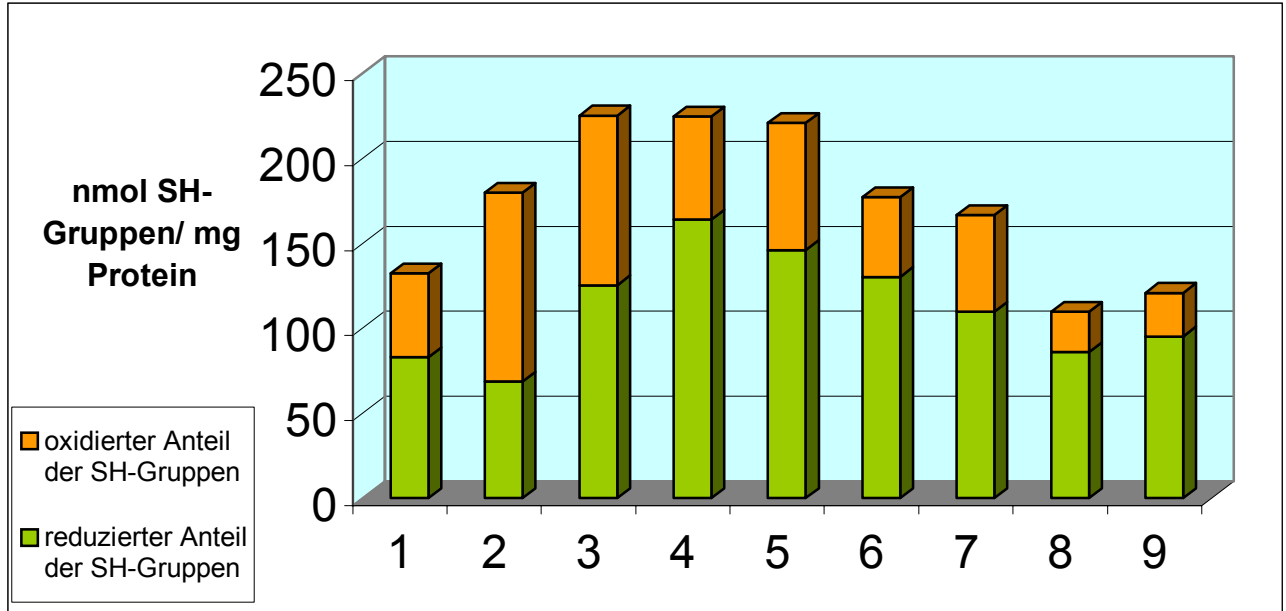
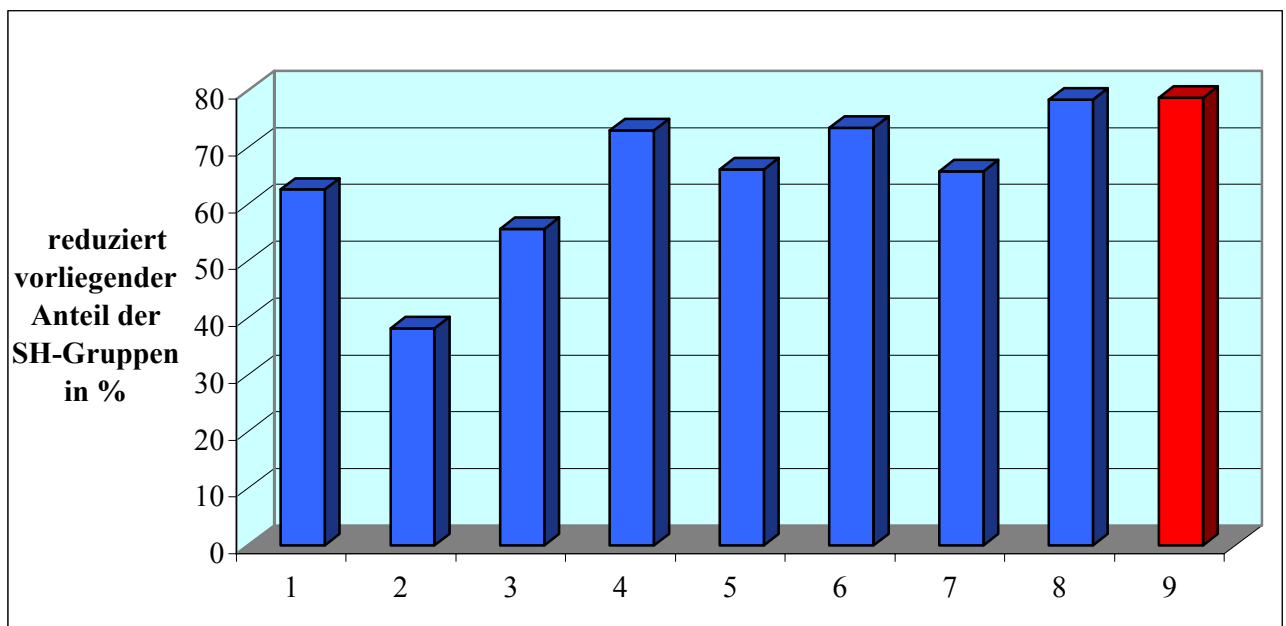


Abbildung 14: Anteil der reduziert vorliegenden SH-Gruppen am Gesamtgehalt der SH-Gruppen von ws Linsenprotein. Die Säulen 1 bis 8 repräsentieren je eine Schicht von 1 mm Dicke vom vorderen (1) bis hinteren (8) Pol. Säule 9 steht für äquatorielles Protein.



4. Diskussion

Diese Studie geht folgenden Fragen nach:

- 1) Stellen die Altersregionen der jungen Linse ein brauchbares Modell für die Organalterung dar und führt dies zu unterschiedlichem Eisenionengehalt der Kristalline in den einzelnen Regionen?
- 2) In wieweit sind die Amadori-Produkte der frühen Glykosilierung und die irreversiblen Glykosilierungs-Endprodukte als Zeichen oxidativen Stresses nachzuweisen?
- 3) Wie hoch ist die Belastung von Linsenprotein durch oxidativen Stress, gemessen am Verhältnis von oxidiert zu reduziert vorliegenden SH-Gruppen in den einzelnen Teilen der Linse?
- 4) Lassen sich Zusammenhänge zwischen diesen Parametern erkennen?

Im Rahmen des Eisennachweises kam es in Ansatz 1 und 2 zu Problemen mit Gelbildung im Reaktionsgefäß, die eine zuverlässige Photometermessung nicht ermöglichten. Basis für die Diskussion sind die Ergebnisse aus Ansatz 3 des Eisennachweises (**Abb. 6 u 7, Tab. 4, S. 36-37**). Es zeigten sich, dass in wasserlöslichem Linsenprotein Eisen in besonderem Maße in den oberflächennahen Schichten der Rinde konzentriert ist. Im Linsenkern dagegen lag der Eisengehalt um bis zu 44% niedriger als in der Rinde. Amadori-Produkte der frühen Glykosilierung fanden sich vor allem in der Äquatorregion, die Carbonylgruppen waren weitestgehend homogen verteilt in den verschiedenen Linsenregionen. Die SH-Gruppen unterliegen besonders in den vorderen kortikalen Schichten der Linse einem hohen oxidativen Stress.

Die Frage, wie die oben genannten Ergebnisse zustande kamen und inwieweit sie die Zusammenhänge zwischen Metallionen und oxidativem Stress erklären, soll in der folgenden Diskussion erörtert werden.

Die Messung des Eisengehaltes von Protein mit der Ferrene S-Methode und ihre Problematik

Die Ferrene S-Methode wurde ausgewählt, da sie unter den gegebenen Arbeitsbedingungen einfach durchzuführen und beliebig oft zu wiederholen war. Außer einem Photometer wurde kein spezielles Gerät benötigt. Die verwendeten Reagenzien gehören entweder zur Standardausstattung

eines Labors oder waren leicht erhältlich. Die Ferrene S-Methode wird als standardisiertes Verfahren zum Beispiel zur Bestimmung der Serumeisenkonzentration in klinischen Labors in Europa und zunehmend auch in Amerika genutzt (**Seligmann und Schleicher, 1999**). Für die Linse wurde mit dieser Methode der redoxaktive Teil der Eisenionen nachgewiesen (**Garner et al., 2000**).

Ein Nachteil dieser Methode stellt ihre geringe Sensitivität dar. Die Möglichkeiten der Absorptions- oder Massenspektrometrie, die gegenüber dem photometrischen Verfahren eine deutlich höhere Sensitivität aufweisen, standen für diese Studie jedoch nicht zur Verfügung.

Die ersten Experimente (Vorversuche) mit der Ferrene S-Methode zur Eisenmessung wurden deshalb mit beinahe gesättigten Proteinlösungen durchgeführt (200 mg/ml). Auf diese Weise sollte eine hohe Eisenkonzentration und damit eine ausreichend hohe Absorption bei der Messung im Photometer erzielt werden (**Abb. 4, S. 32; Tab. 3, S. 34**).

Hierbei ergaben sich allerdings Probleme, die wahrscheinlich auf diese hohe Proteinkonzentration zurückzuführen sind. Nach der Zugabe von ASA oder DTT sowie der Ferrene S-Lösung erstarrte die Lösung in der Küvette zu einer gelartigen Masse (**S. 32**). Es ließen sich zwar Daten zum Eisengehalt im Photometer messen, die aber als unzuverlässig anzusehen sind, da ein Durchmischen der Probe nicht mehr möglich war und sich Luftblasen im Gel bildeten. Daher erübrigt sich an dieser Stelle eine Diskussion der Daten der Vorversuche.

Es stellt sich jedoch die Frage nach der Ursache der Gelbildung. **Garner et al. (2000)** berichten nicht von derartigen Problemen. Sie verwendeten ebenfalls die Kombination von Ferrene S und ASA. Die Proteinkonzentration der Lösungen dürfte aber deutlich geringer gewesen sein als in den Versuchen dieser Studie. Von anderer Stelle wird allerdings berichtet, dass die Behandlung von bovinem Linsenprotein mit ASA unter Anwesenheit von Cu^{2+} oder Fe^{3+} oder mit DTT zu vielfachen Veränderungen der Proteinstruktur führt. Hierzu zählen unter anderem ein erhöhtes Molekulargewicht und Nicht-Disulfid-Quervernetzungen (**Garland, 1990**). Dies könnte eine Aggregation der Proteine gerade in hoch konzentrierter Lösung begünstigen oder sogar wahrscheinlich machen. Den zugrunde liegenden Mechanismus für derartige Proteinaggregation beschrieben **Ortwerth et al. (1994)**. Sie untersuchten die Nicht-Disulfid-Quervernetzung von Linsenproteinen. Ascorbinsäure wird im Gewebe zu Dehydroaskorbat (DHA) oxidiert. Bei transparenter Linse dürfte DHA beinahe vollständig zu Ascorbinsäure reduziert werden, solange ausreichend reduziertes Glutathion vorhanden ist. Ist dies nicht der Fall, entstehen weitere Abbauprodukte der ASA wie 2,3-Diketogulonsäure, L-Xylosen und L-Threose. All diese Produkte

sind laut **Ortwerth et al. (1994)** in der Lage, Proteine untereinander zu vernetzen. Mengenmäßig weniger bedeutsam ist die Quervernetzung durch Diketogulonsäure, die zwei Carbonylgruppen besitzt, welche mit Lysinresten reagieren können. Besonderes Augenmerk richtete die erwähnte Studie aber auf die Aktivität von L-Threose, und es wurde gezeigt, dass L-Threose unter physiologischen Bedingungen durch das Enzym Aldose-Reduktase in Threitol umgewandelt wird. Ist dies nicht der Fall, kann L-Threose mit der ε -Aminogruppe von Lysin reagieren. Die dabei entstehende Schiff'sche Base lagert sich daraufhin in das stabilere Amadori-Produkt um, die über den Maillard-Weg diverse AGE bilden kann (**S. 8**). Über die Reaktion der freien Carbonylgruppe des Amadori-Produktes mit einer weiteren ε -Aminogruppe eines Lysinrestes können sich Quervernetzungen zu benachbarten Proteinen bilden. Nachgewiesen wurden diese Vorgänge durch radioaktiv markierte L-Threose, die sich bei Abwesenheit von Aldose-Reduktase fest in Proteine einlagert.

Diese Beobachtungen liefern eine plausible Erklärung für die Gelbildung im Reaktionsgefäß des Eisennachweises. Es lag einerseits eine über das normale Maß hinaus erhöhte Konzentration an ASA vor. Andererseits dürfte der größte Teil der Metallionen nach ihrer Ablösung vom Protein in der stabileren, reduzierten Form vorgelegen haben (Eisen also als Fe^{2+} -Ion). ASA war zugegeben worden, um eventuelle Fe^{3+} Eisenionen zu reduzieren, da Ferrene S nur mit Fe^{2+} -Ionen einen Komplex bildet, dessen Konzentration sich photometrisch bestimmen lässt. Auf diese Weise entstand DHA, welches bei Abwesenheit von ausreichender Konzentration an Glutathion oder einer verminderten Aktivität der Aldol-Reduktase die oben beschriebenen Reaktionen ermöglicht und zur Protein-Quervernetzung führte. Die sehr hohe Konzentration an Protein in der Reaktionslösung ist sicherlich ein weiterer entscheidender Faktor für die Aggregation des Proteins. Zumindest kann die Gelbildung als Hinweis auf das Vorliegen von Eisen- und Kupferionen gewertet werden, die sich nach ihrer Ablösung vom Protein in einem redoxaktiven Zustand befinden und in der Lage sind, ASA zu oxidieren.

Auch der Einsatz von DTT anstelle von ASA führte zur Gelbildung in der Küvette. Die Molekülstruktur von DTT gibt Hinweise auf entsprechende Reaktionen. Sie trägt zwei SH-Gruppen und kann dadurch benachbarte Proteinmoleküle durch Disulfid-Brücken quervernetzen. Zur Vermeidung der Gelbildung musste eine alternative Vorgehensweise entwickelt werden, um unter Beibehaltung der Ferrene S-Methode die Messung in proteinfreier Lösung zu ermöglichen (**S. 19**). Die aus Linsengewebe extrahierten Proteine wurden in destill. Wasser gelöst. Durch Zugabe von TCA 30% wurde das Protein gefällt und die Eisenionen abgelöst, dann zentrifugiert.

Der Überstand, der neben diversen Salzen die Eisenionen enthielt, wurde konzentriert. In der so erhaltenen Lösung wurde die Eisenionenkonzentration mit Hilfe der Ferrene S-Methode bestimmt, der Eisengehalt des ursprünglich verwendeten Proteins wurde errechnet. Diese Prozedur wurde für Linsenprotein aus 9 Schichten sowie aus dem Äquator separat durchgeführt.

Die Ergebnisse des Eisennachweises und ihre Bedeutung:

Die Ergebnisse, die im 3. Ansatz (**Abb. 6 u. 7, S. 36-37**) der Ferrene S-Methode für wasserlösliches Protein aus insgesamt 9 Schichten der Linse sowie Äquator ermittelt wurden, sind die Grundlage der folgenden Diskussion. Eine wichtige Beobachtung ist, dass in der insgesamt sehr homogen aufgebauten Linse auf engstem Raum Proteine eingebaut sind, deren Eisengehalt stark differiert. So enthält das Protein des Linsenkernes (Schicht 4) mit 11,55 pmol/mg getrocknetem, wasserlöslichen Linsenproteinen lediglich 43% des Eisengehaltes der hinteren Rinde (Schicht 9: 26,85 pmol/mg = 100%). Die Frage, warum derartige regionale Unterschiede entstehen und aufrechterhalten werden können, soll später erörtert werden.

Das Protein des Linsenkerns weist, wie bereits gesagt, die geringste Eisenkonzentration auf. Sowohl zum vorderen als auch zum hinteren Kortex steigt sie gleichmäßig an, so dass man zusammenfassend sagen kann, dass sich das Eisen in der Linse in oberflächennahen Schichten konzentriert. Die niedrigen Werte für äquatorielles Protein haben diesbezüglich wenig Aussagekraft, da sie sowohl oberflächennahes Protein als auch Material aus tieferen Schichten enthalten. Der gesamte bei der Stanzung übrigbleibende, ringförmige Linsenrest wurde nämlich als Äquator definiert. Interessant ist, dass gerade in diesen oberflächennahen und eisenreichen Schichten der Linse die Konzentration von GSH besonders hoch ist. (**Breipohl W, Argirova MD, Kleiner-Reidick M. Verteilung von oxidiertem und reduziertem Glutathion in Kälberlinsen. unveröffentlicht**). GSH ist in der Lage, durch Metallionen induzierten oxidativen Stress abfangen zu können.

Die ermittelten Werte für die Eisenverteilung können allerdings die Situation in der Linse nicht vollständig widerspiegeln. Nicht gemessen wurde der Teil des Eisens, der fest an wasserunlösliches Protein gebunden war. Die aus den einzelnen Schichten der noch jungen Linsen extrahierten Mengen an wasserunlöslichem Protein waren nicht ausreichend für die Durchführung der Ferrene S-Methode. Somit lassen sich keine Aussagen über den Gesamteisengehalt der

einzelnen Schichten machen. Auch lässt sich nicht klären, ob das wasserunlöslich gewordenen Protein der Linsen aufgrund von Änderungen in der Molekülstruktur auch veränderte Metallbindungseigenschaften aufweist.

Des weiteren darf nicht unberücksichtigt bleiben, dass die Proteindichte in der Linse je nach Schicht variiert. Im Linsenkern sind die Kristalline wesentlich dichter „gepackt“ als in der Rinde (**Bours und Ahrend, 1992**). Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurde die Eisenkonzentration pro Gewichtseinheit frischen Linsengewebes mit Hilfe der von **Bours und Ahrend 1992** veröffentlichten Daten zum Protein- und Wassergehalt der einzelnen Linsenregionen errechnet. Es zeigte sich, dass im frischen Linsengewebe die Konzentration der Eisenionen in den oberflächennahen Schichten höher als im Kern der Linse ist (**Abb. 7, S. 37**). Die Eisenkonzentration im Frischgewebe zeigte damit eine ähnliche Verteilung wie die Eisenkonzentration im getrockneten Protein. Allerdings fielen die Unterschiede zwischen Rinde und Kern beim Eisengehalt des Frischgewebes nicht so gravieren aus wie beim Eisengehalt des getrockneten Proteins.

Eine weitestgehend klare Angelegenheit ist die Herkunft der Eisen- und Kupferionen. Da die Linse keine Gefäße besitzt, muss der Nachschub an Eisen- und Kupferionen über das Kammerwasser erfolgen. Diese Ionen diffundieren ins Linsengewebe und werden an Protein gebunden. Auf dem selben Wege müssen auch die Eisen- und Kupferionen in die Linse gelangt sein, die im Rahmen der senilen Katarakt in erhöhtem Maße dort gefunden wurden (**Garland, 1990; Garner et al., 2000**).

Über eine möglicherweise erhöhte Konzentration von Eisen- und Kupferionen im Kammerwasser bei Kataraktpatienten lassen sich in der derzeitig verfügbaren Literatur keine Angaben finden. Eine derartige Genese der senilen Katarakt ist allerdings unwahrscheinlich. Das Kammerwasser als Ultrafiltrat des Blutes dürfte annähernd dieselbe Konzentration von freien Eisen- und Kupferionen aufweisen, wie sie im Blut zu messen sind. Hinweise auf eine erhöhte Serumkonzentration dieser Metalle bei der senilen Katarakt ließen sich nie finden. Allerdings ist bekannt, dass beispielsweise der Morbus Wilson, eine Kupfer-Speicherkrankheit mit Coerulo-plasminmangel und erhöhter Konzentration von freiem Kupfer im Serum, assoziiert ist mit einer höheren Inzidenz der Katarakt. Das legt nahe, dass eine Erhöhung von Kupferionen in Serum und Kammerwasser ausreicht, um über oxidative Mechanismen zu Proteinschäden und zur Katarakt zu führen. Da der Mechanismus einer vermehrten Einlagerung von Eisen- und Kupferionen in die Linse durch deren erhöhte Konzentration im Kammerwasser zumindest als Ursache der senilen Katarakt unwahrscheinlich

ist, soll er an dieser Stelle nicht weiter erörtert werden.

Eine andere Ursache für die Anhäufung der Metalle im Linsenprotein könnten veränderte Eigenschaften der Kristalline darstellen. Eine erhöhte Metallbindekapazität der Proteine ließe sich erklären durch Glykosilierung und Modifikationen von Aminosäuren. So konnten **Qian et al. (1998)** zeigen, dass Proteine wie Albumin, Kollagen und Elastin in glykosiliertem Zustand in der Lage sind, 2-3 mal soviel Eisen- und Kupferionen zu binden wie in unglykosilierter Form. Besonders interessant ist das Ergebniss von **Qian et al. (1998)**, dass in sogenannten „Glykochelaten“ gebundenes Kupfer als metallischer Katalysator fungieren kann und auf diese Weise andere Biomoleküle, in diesem Fall ASA, oxidieren kann. Ähnliche Beobachtungen machten **Argirova und Ortwerth (2003)**. Sie konnten an Rinder-Serumalbumin sowie Linsenprotein von Kälbern zeigen, dass nach Glykosilierung des Proteins durch proteingebundenes Kupfer vermehrt ASA oxidiert und molekularer Sauerstoff zu H_2O_2 reduziert wurden. Glykosiliertes Protein scheint ein schwächerer Ligand für Kupfer in Chelaten zu sein als intaktes Protein, so dass Kupfer eher für Redoxreaktionen zur Verfügung stehen kann. In einer anderen Studie wurde an Katarakt-Linsen mit erhöhtem Metallgehalt gezeigt, dass ein Teil der Eisenionen ebenfalls redoxaktiv ist (**Garner et al. 2000**). Für Kupfer konnte in der vorliegenden Studie allerdings eine derartige Aktivität verneint werden.

Unter Berücksichtigung dieser Informationen ließe sich folgendes Modell aufstellen: während Eisen- und Kupferionen aufgrund ihrer Toxizität im Organismus normalerweise in redox-inaktivem Zustand an Transport- und Speicherproteine wie Transferrin und Ferritin gebunden sind, oder ihre Redoxaktivität durch den Einbau in das reaktive Zentrum von Enzymen kontrolliert wird, können modifizierte Proteine in der Lage sein, als „Falle“ für Metallionen aufzutreten und sie in redoxaktivem Zustand zu akkumulieren. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch **Fujimoto et al. (1994)**. Sie beobachteten, dass glykosiliertes Transferrin Eisenionen freisetzt und sie teilweise in redoxaktiver Form bindet. Glykosiliertes Transferrin war darüber hinaus in der Lage, O_2^- und OH^- zu bilden. Hieraus lässt sich schließen, dass derartig modifizierte Proteine zu oxidativem Stress führen und lokal Schäden verursachen.

Es stellt sich die Frage, wie sich die ermittelten Werte zur Eisenverteilung in der Linse interpretieren lassen. Folgende Faktoren sind hierbei von Bedeutung:

- 1) Die Eisenverteilung in den einzelnen Schichten der Linse könnte durch unterschiedliche Fähigkeiten der jeweiligen Kristalline, Metalle zu binden, erklärt werden. Dies könnte auch

eine Ursache dafür sein, dass sich auf engstem Raum in der Linse stark unterschiedliche Metallkonzentrationen aufbauen und halten. Stellt sich die Frage, ob oxidativ verändertes Protein auch eine veränderte Eisenbindekazapazität hat. In den weiteren Versuchen, in denen sowohl EGP als auch AGE in den entsprechenden Schichten gemessen wurden, konnten jedoch keine erhöhten Proteinmodifikationen in Regionen nachgewiesen werden, die durch hohe Eisenspeicherung auffielen. Durch die Verwendung relativ junger Kälberlinsen in dieser Studie (Alter bei Schlachtung etwa 8 Monate) war nur ein relativ geringes Maß an AGE zu erwarten. Auch die im NBT-Test gemessenen Amadori-Produkte zeigten keine Parallelen zur Verteilung der Eisenionen. Dieser Ansatz kann plausibel sein für die Akkumulation von Metallionen in senilen Linsen und besonders im Rahmen der senilen Katarakt. Die an jungen Linsen gemachten Beobachtungen kann dieses Modell nicht zufriedenstellend erklären.

- 2) Weitere Fragen ergeben sich, wenn man sich das Wachstumsverhalten der Linse vor Augen führt. Zwar wächst die Linse lebenslang durch apositionelle Anlagerung neuer Linsenfasern. Der allergrößte Teil des Wachstums findet allerdings pränatal und im ersten Lebensjahr statt. **Hockwin et al. (1963)** lieferten genaue Daten über die Dynamik von Gewichts- und Volumenentwicklung von Rinderlinsen. Bereits zum Zeitpunkt der Geburt der Tiere hatten die meisten Linsen ein Gewicht von über einem Gramm, mit 8 Monaten von etwa 1,6 Gramm wie die in dieser Studie verwendeten Linsen. Gegen Ende des ersten Lebensjahres schwächt sich das Wachstum stark ab. Auch nach 10 bis 15 Lebensjahren überschreitet das Linsengewicht selten die Marke von 2,5 Gramm.

Somit stellt sich die Frage, wie sich die Eisenverteilung in der Linse entwickelt, wenn die Wachstumsgeschwindigkeit der Linse im zweiten Lebensjahr der Tiere nachlässt. Generell muss beachtet werden, dass diese Studie zur Eisenverteilung in der Linse durch die Verwendung Materials gleichalter Kälber nur eine „Momentaufnahme“ der Situation darstellt. Neben der Wachstumsgeschwindigkeit gibt es viele weitere altersabhängige Faktoren, die Einfluss nehmen könnten auf das Muster der Eisenverteilung. Mit dem steigenden Alter nimmt das Linsenvolumen zu, der Wassergehalt des Gewebes sinkt, die Stoffwechselaktivität des Linsenepithels verringert sich und die Verfügbarkeit von Antioxidantien im Linsengewebe nimmt ab (**Hockwin et al., 1963**). Um dem Einfluss dieser Faktoren Rechnung zu tragen, wären Messungen der Eisenkonzentration in Linsen von

Tieren unterschiedlichen Alters nötig.

- 3) Von weiterem Interesse ist die Frage, an welche Proteine, abgesehen von Kristallinen, sowie in welchen Enzymen die gemessenen Eisenionen noch gebunden sein könnten. Als spezifisches intrazelluläres eisenbindendes Protein kommt Ferritin in Betracht. **Garner et al. (2000)** ermittelten Daten zur Ferritinverteilung in gesunden menschlichen Linsen und Katarakt-Linsen. Es zeigte sich, dass im wasserlöslichen Extrakt gesunder Linsen Ferritin im Kortex in leicht erhöhtem Maße zu finden ist im Vergleich zum Linsenkern, jeweils bezogen auf das Proteintrockengewicht. Der höchste Wert wurde immunhistochemisch im Linsenepithel nachgewiesen. In Linsen von Kataraktpatienten dagegen wurde im wasserlöslichen Anteil des Linsengewebes sehr wenig Ferritin gefunden. Ein Teil des fehlenden Ferritins wurde in der wasserunlöslichen Fraktion gefunden. Besonders extrem war dieser Zustand im Kern. Hier wurde mehr Ferritin in der wasserunlöslichen als in der löslichen Phase gefunden. **Garner et al. (2000)** schließen daraus, dass auch Ferritin an Quervernetzungsreaktionen im alternden Gewebe teilnimmt. Zusätzlich ist bekannt, dass Metalle, die an oxidativ modifiziertes Protein gebunden sind, teilweise noch redoxaktiv sind. Offen bleibt in dieser Studie, inwieweit das Ferritin in der wasserunlöslichen Phase noch seine natürliche Funktion erfüllen kann und Eisen bindet.
- Grundsätzlich können aber diese Ergebnisse zur Ferritinverteilung nicht erklären, warum die Eisenkonzentration in getrübbten Linsen üblicherweise erhöht ist, zumal in diesen Linsen der Gesamtgehalt an Ferritin erniedrigt ist. Auch gibt es keine Daten darüber, an welchen Stellen einer Kataraktlinse sich ein besonders hoher Eisengehalt finden lässt. Das Bild der Eisenverteilung in den gesunden Kälberlinsen entspricht auch nicht exakt demjenigen der Ferritinverteilung für normale menschliche Linsen in Garners Studie. Allerdings wurde diesbezüglich nur der Kortex mit dem Nukleus verglichen, auf eine feinere Schichtung wurde verzichtet. Da es sich bei den Kälberlinsen um junges, wenig modifiziertes Protein mit sehr hohem Anteil der wasserlöslichen Fraktion handelt, dürfte die Eisenspeicherung durch Ferritin insgesamt eine wichtige Rolle spielen. Mit fortschreitender Alterung des Gewebes bis hin zur Katarakt ist dagegen mit zunehmender Eisenbindung durch modifiziertes Linsenprotein zu rechnen.

Ein Teil der Metallionen ist darüber hinaus an intrazelluläre Enzyme, beispielsweise Katalase und Cytochrome, gebunden. Dies betrifft in erster Linie die Schicht 1, da sie das

stoffwechselaktive Linsenepithel enthält. Allerdings dürfte die Gesamtmenge des Eisens, das Funktionen in den aktiven Zentren von Enzymen wahrnimmt, einen relativ geringen Anteil am gesamten Eisengehalt haben. Es ergibt sich für die Eisenverteilung in der Linse auch nicht das Bild, wie man es für die Verteilung eisenhaltiger Enzyme erwartet, nämlich eine Konzentration in Schicht 1. Die im aktiven Zentrum von Enzymen gebundenen Ionen dürften aufgrund der Spezifität dieser Enzyme für bestimmte Substrate nicht für unkontrollierte Redoxreaktionen und damit für die Bildung von ROS zur Verfügung stehen.

Divalenten Metallionen und ihr Beitrag zum oxidativen Stress

Nachdem die möglichen Ursachen der hier ermittelten Eisenverteilung in der Linse diskutiert worden sind, wird in diesem Abschnitt genauer auf die chemischen Reaktionen im Gewebe eingegangen, an denen redoxaktive Eisen- und Kupferionen teilhaben können. Bereits in Kapitel 1.1 wurde erwähnt, dass divalente Metallkationen in hohem Maße mitbeteiligt sind an der Entstehung oxidativen Stresses. Von besonderer Bedeutung ist diesbezüglich ihre Fähigkeit, die Umwandlung weniger aggressive Sauerstoff-Spezies wie H_2O_2 und Superoxidanionradikal, die in Primärreaktionen entstanden sind, zu dem weitaus reaktionsfreudigerem Hydroxylradikal zu katalysieren (Garland, 1990; Augustin et al., 2001).

Um den entscheidenden Punkt der Entstehung von ROS zu erläutern, soll zunächst die Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser im Organismus erläutert werden. Es handelt sich um eine 4-Elektronen-Reduktion. Aus der 1-Elektronenreduktionsstufe, dem Superoxidanionradikal, entsteht auf enzymatischem Wege (durch SOD) H_2O_2 . Dieses wiederum wird durch die Katalase oder Peroxidasen zum Hydroxylradikal und in einem letzten Schritt zu H_2O reduziert. Der gleiche Prozess findet in der Atmungskette statt. Die benötigten Enzyme sind im Zytochromoxidasekomplex enthalten. Nur so kann verhindert werden, dass die teilweise sehr reaktiven Zwischenprodukte freierwerden und in der Zelle Schäden anrichten. Im Gegenteil, freie Radikale können auf diesem Weg enzymatisch entgiftet werden.

Trotzdem ist die Zelle permanent einer gewissen Konzentration von Radikalen ausgesetzt: 1-2% des vom Körper aufgenommenen Sauerstoffs werden nicht bis zum Wasser reduziert, sondern gelangen nach unvollständiger Reduktion als reaktive Sauerstoffmetabolite in die Umgebung, vorwiegend als Superoxidanionradikal (Augustin et al., 2001). Freie Radikale werden im Rahmen

der Immunabwehr von Leukozyten produziert und entstehen somit in besonderem Maße bei Entzündungsprozessen. Weitere physiologische Radikalquellen sind beispielsweise Flavoproteine, Fe-S-Proteine und Chinone.

Darüber hinaus entstehen im Auge freie Radikale im Rahmen photodynamischer Reaktionen. Ein Photosensibilisator nimmt die Energie der elektromagnetischen Strahlung auf und transferiert sie auf andere Moleküle. Auf diese Weise können aus Sauerstoff Radikale oder der Singulett-sauerstoff, ein auf ein höheres Energieniveau gehobenes Sauerstoffmolekül, entstehen. Als Photosensibilisatoren konnten in erster Linie die farbigen Abbauprodukte von Tryptophan, hauptsächlich N-Formylkynurenin, aber auch die Aminosäuren Tryptophan, Histidin, Cystein, Thyrosin, Methionin und Riboflavin ermittelt werden (**Grossweiner, 1984; Varma et al., 1984**).

Neben dem oben erwähnten Weg der enzymatisch kontrollierten, unvollständigen Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser besteht die Möglichkeit der Bildung aggressiver Hydroxylradikale immer dann, wenn Superoxidanionradikale oder H_2O_2 auf katalytisch aktive Eisenionen treffen.

In der Fenton-Reaktion wird durch Superoxid, GSH oder ASA ein $\text{Fe}^{\text{III}+}$ -Komplex zu einem $\text{Fe}^{\text{II}+}$ -Komplex reduziert, der daraufhin das durch Dismutation entstandene H_2O_2 zum OH-Radikal reduziert (**Garland, 1990; Augustin et al., 2001**).

Eine weitere eisenabhängige Reaktion stellt die Haber-Weiss-Reaktion dar, in der beim Zusammentreffen von Superoxidanionradikal, H_2O_2 und katalytisch aktivem Fe^{2+} der Sauerstoff unvollständig reduziert wird zum Hydroxylradikal. Es wurde beobachtet, dass Superoxidradikale Schäden an der DNA hervorrufen, und zwar insbesondere dann, wenn Metallionen in redoxaktivem Zustand zur Verfügung stehen. Das Hydroxylradikal wird als die Sauerstoffspezies hoher Toxizität angesehen, auf welche der allergrößte Teil der durch ROS verursachten Schäden zurückzuführen ist, auch wenn letzte Beweise dafür fehlen (**Welch et al., 2002**).

Da das Hydroxylradikal hoch reaktiv ist, kann es nicht wie andere ROS, z.B. H_2O_2 über eine weite Strecke diffundieren und entgiftet werden, sondern wird in unmittelbarer Umgebung seines Bildungsortes mit organischen Strukturen reagieren. Viele oxidative Schäden an Proteinen wie Strangbrüche und Modifikationen von Aminosäuren, aber auch Schäden an DNA, haben sich als ortsspezifisch herausgestellt. Ortsspezifisch bedeutet, dass ROS bevorzugt Stellen in der Aminosäuresequenz eines Proteins bzw Basensequenz der DNA schädigen, die sich in der Nähe von potentiellen Bindungsstellen für Eisen- oder Kupferionen befinden. So berichten **Ookawara et al. (1992)** von der ortsspezifischen Fragmentierung von Cu-Zn-Superoxid Dismutase durch Glykosilierung unter wahrscheinlicher Beteiligung von ROS. Bereits 1990 hatte **Garland** eine

ortsspezifische, metallkatalysierte Oxidation von Kristallinen in der Kataraktentwicklung vorgeschlagen. **Welch et al. (2002)** berichten in einer Zusammenfassung der aktuellen Ergebnisse, es sprächen viele Fakten dafür, dass eisenvermittelte Oxidationen ortsspezifisch sind, sowohl was DNA- als auch Proteinschäden betrifft. Es steht fest, dass die Reste der Aminosäuren Prolin, Histidin, Arginin, Lysin und Cystein besonders stark oxidativen Modifikationen ausgesetzt sind. Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgendes Modell oxidativer Proteinschädigung ableiten. Fe^{2+} bindet an spezifische Eisenbindungsstellen der Proteine, möglicherweise unter Einbeziehung der oben genannten Aminosäuren. Die so entstandenen Fe^{2+} -Protein-Komplexe sind redoxaktiv, können also beispielsweise die Reduktion von H_2O_2 zum Hydroxylradikal katalysieren. Diese wiederum würden an Ort und Stelle zu oxidativen Modifikationen führen.

Interessant ist die für dieses Modell essentielle Eigenschaft von Metallionen, nicht zwangsläufig durch Bindung an Protein für den Organismus unschädlich zu werden. Viele Studien unterstützen diese Theorie, wie bereits bei der Diskussion der Eisenverteilung erwähnt worden ist (**Fujimoto et al., 1994; Qian et al., 1998; Garner et al., 2000; Argirova und Ortwerth, 2003**).

Von besonderem Interesse wäre hierbei die Erforschung der Eisenbindungsstellen an unterschiedlichen Molekülen der Zelle. Wenig ist bisher bekannt über die Eigenschaften dieser Stellen, ihr Verhalten unter physiologischen Bedingungen und der Einfluss von oxidativem Stress und Schaden auf die Eisenspeicherung im Organismus.

Die Ergebnisse zum Fruktosamingehalt und Carbonylgruppengehalt des Linsenproteins

Die Messungen zu Fruktosamingehalt und Carbonylgruppengehalt wurden durchgeführt, um Anzeichen für oxidativen Stress in wasserlöslichem Linsenprotein zu erhalten.

Im Rahmen der nicht-enzymatischen Glykosilierung entstehen reversible, sogenannte frühe Glykosilierungsprodukte, die zuerst als Schiff-Base, dann als Ketoamin (Amadori-Produkt) vorliegen (**Wolff et al., 1991; Augustin et al., 2002**). Die nichtenzymatische Glykosilierung und oxidativer Stress werden als zwei untrennbar miteinander verbundene Faktoren angesehen (**Sakurai und Tsuchiya, 1988; Mullarkey et al., 1990; Wolff et al., 1991**).

Die Amadori-Produkte lassen sich im NBT-Test nachweisen. Der Spiegel an EGP korreliert mit der Glukosekonzentration des Kammerwassers. Ähnlich wie die Untersuchung auf glykosiliertes Hämoglobin bei Diabetikern (HbA_{1c} -Test) gibt der NBT-Test Auskunft über die Glukose-

belastung der Proteine durch die Zellen umgebende flüssige Medien. Aus den Produkten der frühen Glykosilierung entstehen durch Dehydratation, Kondensierung und molekulare Umlagerung irreversibel modifizierte Proteine (AGE). Glykosiliertes Protein konnte zudem als Radikalquelle identifiziert werden (**Sakurai et Tsuchiya, 1988**). **Argirova und Breipohl (2002)** zeigten, dass AGE zur photodynamischen Sauerstoffaktivierung befähigt sind. Diese Autoren verwendeten Protein aus Kälberlinsen, welches mit Glyoxal, Methylglyoxal, ASA und Fruktose glykosiliert worden war. Unter UVA-Bestrahlung ($200\text{J}/\text{cm}^2$) produzierte das modifizierte Protein die 2-3-fache Menge an Singulett-Sauerstoff und 30-80% mehr Superoxidradikale als unbehandeltes Protein.

Die vorliegenden Resultate des NBT-Tests zeigen kaum Übereinstimmung mit anderen gemessenen Parametern des oxidativen Stresses, seien es die Ergebnisse der Carbonylgruppenbestimmung oder des oxidativen Status der SH-Gruppen. Der höchste Fruktosamingehalt wurde für äquatorielles Protein ermittelt. Dieser Wert wurde als 100% definiert, die übrigen Werte hierzu in Bezug gesetzt. Da auch der hintere Kortex leicht erhöhte Werte zeigt (mit 66,6% des Äquatorwertes insgesamt der zweithöchste Wert), lässt sich hieraus die Vermutung ableiten, dass besonders die äußeren Schichten der Linse anfällig gegenüber der nichtenzymatischen Glykosilierung sind. Sie sind der Glukose, die aus dem Kammerwasser in das Linsengewebe diffundiert, als erste ausgesetzt.

Die vordere Rinde (Schicht 1) zeigt keinen sonderlich erhöhten Wert für frühe Glykosilierungsprodukte, Schicht 2 sogar den niedrigsten aller gemessenen Werte. Von Bedeutung könnte hierbei sein, dass Schicht 1 das Linsenepithel enthält, die stoffwechselaktivste Region der Linse mit entsprechend hohem Glukoseverbrauch.

Es hat sich gezeigt, dass die Verteilung der EGP eine völlig andere ist als die der AGE, obwohl letztere zum großen Teil aus den frühen Glykosilierungsprodukten unter Einwirkung von ROS entstehen. Bei den AGE handelt es sich um eine chemisch heterogene Gruppe oxidativ veränderter Aminosäuren von langlebigen Linsenproteinen, an denen das CML einen großen Anteil hat. Carbonylgruppen sind vermehrt vorzufinden in Linsen älterer Individuen und in hohem Maße in denen von Kataraktpatienten. Das Vorkommen von Protein-Carbonylverbindungen gilt als Marker für Modifikationen von Aminosäuren durch metallkatalysierte Oxidation (**Garland, 1990; Jahngen-Hodge, 1994**).

Es zeigte sich insgesamt eine homogene Verteilung von Carbonylgruppen im wasserlöslichen Protein der verschiedenen Linsenregionen. Lediglich die Schichten 2 und 6 zeigten einen leicht

erhöhten Gehalt an Carbonylgruppen. Wenn man diese Werte vergleicht mit den hier ermittelten Verteilungsmustern von Eisen und EGP, lässt sich keine Übereinstimmung erkennen. Das heisst, weder ein besonders hoher Eisengehalt, noch das Vorliegen hoher Konzentrationen an EGP in einer Linsenregion führen zwangsläufig zu einer hohen Konzentration an Carbonylgruppen. Dies ist insofern überraschend, weil EGP als Vorstufe der AGE gelten und divalente Metallkationen als wichtiger Faktor in der Entstehung von AGE anzusehen sind. Es muss berücksichtigt werden, dass nur der Teil des Eisens nachgewiesen wurde, welcher an wasserlösliches Protein gebunden war. Zudem wurde nicht gemessen, welcher Anteil des Eisens für Redoxvorgänge im Gewebe und damit zur Bildung von AGE zur Verfügung stand.

Des weiteren muss bedacht werden, dass es sich bei dem vorliegenden Material um Protein junger Kälber handelt, bei denen eine irreversible Schädigung der Linse noch nicht sehr weit fortgeschritten sein dürfte. Gerade in dem untersuchten wasserlöslichen Protein sollten die Werte niedriger sein als in dem nur in geringen Mengen gewonnenem und nicht untersuchten wasserunlöslichen Protein. Man kann erwarten, dass sich im wasserunlöslichen Protein ein wesentlicher Teil der AGE der Linse findet. Vor diesem Hintergrund müssen die Ergebnisse der vorliegenden Messung gesehen werden, die keine großen Unterschiede bezüglich des Carbonylgruppengehaltes in wasserlöslichem Protein verschiedener Linsenregionen ergeben hatten.

Interessant wäre es in diesem Zusammenhang der Frage nachzugehen, ob sich im Rahmen der Alterung in bestimmten Linsenregionen Carbonylgruppen vermehrt in wasserlöslichem Protein nachweisen lassen.

Das mit DNPH behandelte und getrocknete Linsenprotein war deutlich leichter als das Protein der Kontrollproben, die nur mit HCl behandelt worden waren. Eine Erklärung wäre, dass Protein durch die Inkubation mit DNPH hydrophobe Eigenschaften entwickelt, während in den Kontrollproben die hydrophilen Eigenschaften des Linsenproteins erhalten bleiben. Unbehandeltes Protein würde demnach in getrocknetem Zustand mehr Wasser binden als mit DNPH behandeltes Protein.

Der Sulfhydrylgruppenstatus als Parameter des oxidativen Stresses

Kristalline sind reich an Cystein. Zwar ist die Funktion der Sulfhydrylgruppen der Cysteine im Linsenprotein noch nicht ausreichend geklärt, es hat sich aber gezeigt, dass durch die Oxidation ihrer SH-Gruppen die Kristalline ihre Konformation ändern und untereinander Disulfidbrücken ausbilden. Dies führt zur Ausbildung hochmolekularer wasserunlöslicher Aggregate und damit zur

Eintrübung der Linse. Aus diesem Grunde sind die Zellen der menschlichen Gewebe, insbesondere der Linse, bestrebt, die SH-Gruppen ihrer Proteine und Enzyme in reduziertem Zustand zu erhalten. Dies geschieht auf verschiedenen Wegen. Einerseits ist ein Teil der Cysteine durch Konformation und Faltung so sehr im inneren der Proteinmoleküle gelagert, dass sie nicht zugänglich sind für oxidative Noxen. Allerdings ist es denkbar, dass anderweitige Proteinmodifikation wie die Oxidation von Aminosäuren, zu Konformations-änderungen führen und so SH-Gruppen freilegen, die vorher der Oxidation nicht zugänglich waren (**Hanson et al., 2000**).

Um die oxidierbaren SH-Gruppen in reduziertem Zustand zu erhalten, ist das Glutathion-System der Zellen von entscheidender Bedeutung. GSH ist in der Lage, mit oxidierten SH-Gruppen der Proteine zu reagieren und so ein gemischtes Disulfid (PSSG=gemischtes Disulfid Protein-Glutathion) zu bilden. Dies schützt die SH-Gruppen wirkungsvoll vor weitergehender, dann irreversibler Oxidierung (**Thomas und Mallis, 2001**). Irreversibel wurde dabei definiert als nicht mehr reduzierbar durch DTT und Natriumborhydrid. Hierbei handelt es sich um die zwei-Elektronen-Oxidationsstufen Protein-SO₂H (Sulfinsäure) und Protein-SO₃H (Sulfonsäure).

In Versuchen mit Protein, Zellkulturen und Tieren konnte gezeigt werden, dass ein um 30-40% verminderter zellulärer GSH-Spiegel zu einem Anstieg irreversibel oxidierten Cysteine von Carboanhydrase III führte (**Lii et al, 1994; Cabiscol und Levine, 1995**). **Thomas und Mallis (2001)** sprechen davon, dass in Proteinen aus der Leber gesunder Ratten lediglich 1-2% der Cysteine irreversibel oxidiert sind. Dies lässt vermuten, dass Zellen mit intaktem Glutathionsystem in der Lage sind, einen Grossteil der SH-Gruppen in reduziertem Zustand zu erhalten. Bekannt ist, dass in älteren Individuen der GSH-Spiegel absinkt und gleichzeitig vermehrt irreversibel oxidierte SH-Gruppen in Proteinen nachweisbar sind (**Cabiscol und Levine, 1995; Nuttal et al., 1998**).

Experimentell lässt sich PSSG zum Beispieldurch die Zugabe von H₂O₂ erzeugen. H₂O₂, wie es auch im Kammerwasser vorkommt, oxidiert GSH zu GSSG (ox. Glutathion). Dieses wiederum kann mit intakten SH-Gruppen zu PSSG reagieren. In weiteren Reaktionsschritten kann PSSG intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Von hoher Bedeutung ist die Fähigkeit der Zellen, PSSG wieder zu GSH und reduzierten proteinständigen SH-Gruppen reduzieren zu können. Die an diesem Schritt beteiligten Enzyme sind u.a. Glutathionreduktase, Thioltransferase und Thioredoxin. Glutathionreduktase reduziert PSSG NADPH-abhängig, ist allerdings selbst leicht durch oxidative Schädigung zu inaktivieren (**Cherian et al., 1997**). Thioltransferase reduziert oxidierte SH-Gruppen GSH-abhängig und kommt in fast allen Mikroben, Pflanzen und tierischen

Gewebe vor. Das Molekül der Thioltransferase zeigt eine hohe Resistenz gegenüber oxidativen Schäden durch H_2O_2 (**Lou, 2003**). Thioredoxin wurde kürzlich in der Linse von Mensch und Maus gefunden. Dieses Enzym ist beteiligt am Reparaturprozess von oxidativ modifiziertem Linsenprotein. **Yegorova et al. (2003)** konnten an menschlichen Linsenepithelzellen nachweisen, dass bereits 10 min nach Beginn einer H_2O_2 -induzierten oxidativen Stresssituation die Transkription von mRNA des Thioredoxin 1 um 50% zunimmt. Das Thioredoxinsystem wird von diesen Autoren als ein wichtiges Schutzsystem angesehen, welches die Kristalline der Linse in reduziertem Zustand hält.

Interessant für die Kataraktforschung sind die SH-Gruppen der Kristalline, da man weiß, dass im Alter, aber in besonders starkem Maße in Katarakt-Linsen die GSH-Konzentration in den Linsenfasern abnimmt, während gleichzeitig die Konzentration an PSSG zunimmt (**Lou et al., 1990**). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in den Kristallinen vermehrt intermolekulare Disulfidbrücken zu finden sind, die mitbeteiligt sind an der Zunahme der wasserunlöslichen Fraktion der Linsenproteine im Alter. **Hanson et al. (2000)** schrieben zu diesem Thema, dass es sich bei den Bestandteilen der wasserunlöslichen Fraktion um eine sehr heterogene Gruppe an Proteinen handele, die einer genauen Analyse nur sehr schwer zugänglich sei. Die Tatsache, dass sich wasserunlösliches Protein teilweise in Guanidin-HCl lösen lässt, zeigt, dass ein Teil des wasserunlöslichen Linsenproteins durch hydrophobe Wechselwirkungen zustande kommt.

In der wasserunlöslichen Fraktion des Linsenproteins lassen sich Moleküle mit hoher Masse nachweisen, die durch Aggregation und Quervernetzung von Kristallinmolekülen entstehen. **Doss-Pepe et al. (1998)** konnten durch Behandlung von bovinem wasserunlöslichen Linsenprotein mit DTT die hohen Molekülmassen vermindern. Dies werteten sie als einen Hinweis darauf, dass Moleküle des wasserunlöslichen Proteins teilweise durch Disulfid-Quervernetzungen zusammengehalten werden. Es wurde geschätzt, dass ca. 19% der wasserunlöslichen Fraktion an der Ausbildung von Disulfid-Vernetzung beteiligt waren. Obwohl durch die hohe Korrelation zwischen Kataraktentwicklung und der Zunahme der wasserunlöslichen Fraktion die Bedeutung der Disulfidbrücken für die Eintrübung der Linse höchst wahrscheinlich ist, kann sie nicht als bewiesen gelten.

Der wesentliche Grund für die erhöhten Molekülmassen in der wasserunlöslichen Fraktion sind laut **Hansen et al. (2000)** die nicht-Disulfid-Quervernetzungen, von denen erst ein kleiner Teil identifiziert wurde. Nachweisen ließen sich Histidinoalanin, Pentosidin, Lanthionin, durch Transglutaminase verbundene Glutamin, Lysin-Reste und verschiedene Produkte der Maillard-

Reaktion. **Lou et al.** veröffentlichten **1990** eine Studie an Rattenäugen, in deren Rahmen die Bedeutung von zwei gemischten Disulfiden für den Linsenstoffwechsel beschrieben wurde. Zum einen handelte es sich um das bereits oben erwähnte PSSG, zum anderen um Protein-Cystein. Die Autoren fanden ein unterschiedliches Verteilungsmuster dieser beiden Disulfide. Das meiste PSSG wurde im Kortex und in der wasserlöslichen Fraktion der Linsenproteine gefunden, während das Protein-Cystein vorwiegend im Kern und wasserunlöslichen Protein nachzuweisen war. Ältere Linsen hatten sowohl mehr wasserunlösliches Protein als auch mehr Protein-Cystein als jüngere Linsen. Als Voraussetzung für die Entstehung von Protein-Cystein wird eine ausreichende Menge an Cystein im Kern postuliert, die im Laufe des Lebens langsam oxidiert wird und so zur Bildung gemischter Disulfide beiträgt. Weiteres ist nicht bekannt über die Entstehungsursachen von Protein-Cystein.

In der Studie von **Lou et al. (1990)** wurde bei H_2O_2 -induzierter Katarakt lediglich eine Erhöhung des PSSG-Anteils und Erniedrigung des GSH-Gehaltes nachgewiesen, nicht jedoch ein Effekt auf das Protein-Cystein. **Lou et al. (1990)** vermuten, dass die Bildung von PSSG in Verbindung steht mit der durch H_2O_2 induzierten Katarakt, während Protein-Cystein von ihnen mit der Bildung wasserunlöslichen Proteins im Rahmen der normalen Alterung in Verbindung gebracht wird.

All diese Veränderungen an Proteinen, seien es die reversible bzw. nicht-reversible Oxidierung, oder die Bildung von gemischten Disulfiden, können zum Verlust der Wasserlöslichkeit der Kristalline führen. Darüber hinaus können die Kristalline wichtige biologischen Funktionen verlieren. In diesem Zusammenhang berichten **Cherian et al. (1997)** von der Chaperon-Funktion von α -Kristallin. Bekannt ist, dass α -Kristallin mit denaturiertem oder teilweise ungefaltetem Protein einen stabilen Komplex bilden und auf diese Weise weitere Denaturierung und Aggregation des Proteins verhindern kann. **Cherian et al. (1997)** zeigten, dass sich durch die Inkubation von Linsenprotein mit oxidiertem Glutathion (GSSG) gemischte Disulfide bildeten (PSSG) und dass gleichzeitig die Chaperon-Funktion des α -Kristallins abnahm. Auch wenn ein letzter Beweis für diesen Zusammenhang fehlt, ist dies doch als sicherer Hinweis dafür zu werten, dass bereits die Bildung von PSSG, die eine reversible Oxidation darstellt und in geringen Mengen in jeder Zelle vorkommt, Linsenprotein in seiner Funktion schädigen kann.

Einen weiteres Beispiel für den Funktionsverlust von Protein durch oxidative Modifikationen erwähnen **Thomas und Mallis (2001)**. Sie berichten, dass das Enzym für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GSH-Synthese, die γ -Glutamylcystein-Synthase, mehrere reaktive Cysteine enthält und damit anfällig ist für (nichtreversible) oxidative Schäden.

Solche Schäden könnten dann zu einer verminderten GSH-Produktion beitragen, wie sie im Alter beobachtet wird.

All diese Beobachtungen zeigen die wichtige Rolle der SH-Gruppen im Linsenprotein auf. Daher liefert der Nachweis der oxidierten und reduzierten SH-Gruppen ein wichtiges Maß für den oxidativen Stress, dem die einzelnen Regionen der Linse ausgesetzt sind, und der Wirksamkeit der antioxidativen Schutzmechanismen des Linsengewebes. In den Ergebnissen dieser Studie zeigten sich große Unterschiede für die einzelnen Regionen der Linse, sowohl was den Gesamtgehalt an SH-Gruppen, als auch den Anteil der reduziert vorliegenden Reste angeht.

Gemessen wurde der SH-Gruppengehalt jeweils vor und nach Reduktion mit Natriumborhydrid. Es wurde der Gesamtgehalt an SH-Gruppen von wasserlöslichem Linsenprotein bestimmt und unterschieden, ob sich die SH-Gruppen in reduziertem oder reversibel oxidiertem Zustand befanden. Die irreversibel oxidierten SH-Gruppen entzogen sich mit dieser Methode jeglicher Analyse. Bedenkt man, dass in intakten Zellen nur sehr geringe Konzentrationen hiervon gefunden wurden (**Thomas und Mallis, 2001**) und dass in dieser Studie lediglich die wasserlösliche, wenig der Oxidation ausgesetzte Fraktion gesunder junger Linsen eingesetzt wurde, lässt dies keinen hohen Anteil der irreversibel oxidierten SH-Gruppen erwarten.

Somit stellen die im Versuchsmaterial oxidiert vorliegenden, aber mit Natriumborhydrid reduzierbaren SH-Gruppen Verbindungen der ein-Elektronen-Oxidationsstufe dar, zu der die gemischten Disulfide PSSG, Protein-Cystein oder intermolekulare Disulfidbrücken gehören. Da die beiden letztgenannten Verbindungen aber fast ausschließlich in wasserunlöslichem Protein zu finden sind, kann man davon ausgehen dass der allergrößte Teil der hier bestimmten oxidierten SH-Gruppen an Glutathion gekoppelt war.

Besonders auffallend war der teilweise hohe Anteil der oxidierten SH-Gruppen (**Tab. 8, S. 44; Abb. 13 u. 14, S. 45**). So waren in Schicht 2 nur 38,2% der SH-Gruppen in reduziertem Zustand nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass durch die Bildung von PSSG die irreversible Oxidation der Cysteine in den Kristallinen wirksam verhindert wird, wobei die noch sehr hohe Antioxidantienkonzentration im jungen Gewebe unterstützend wirkt. Die Studie von **Thomas und Mallis (2001)** kommt zu ähnlichen Ergebnissen. Jedoch scheinen die Zellen, die die Linsenfasern bilden, teilweise nicht in der Lage zu sein, in ausreichendem Maße für ein reduzierendes Milieu zu sorgen und so die nicht reversible Oxidation der SH-Gruppen zu verhindern. Dies mag an einer verminderten Aktivität antioxidativer Schutzenzyme wie der Glutathionreduktase und einer verminderten Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form

von NADPH liegen. Daten zur Verteilung von NADPH in der Linse sind in der aktuellen Literatur nicht zu finden. Es zeigt jedoch in jedem Fall die außergewöhnliche Belastung der Linse durch ROS, verursacht einerseits durch die lichtexponierte Lage, andererseits durch den langsamen Stoffwechsel, die indirekte Ernährung über das Kammerwasser und die langen Diffusionsstrecken innerhalb der Linse.

Die Frage, warum in den einzelnen Schichten der Linse die Belastung durch oxidativen Stress derart unterschiedlich ist, bleibt noch zu diskutieren. Die Messdaten zeigen, dass dieser Stress sich bevorzugt in den vorderen Abschnitten der Linse, mit einem Schwerpunkt in Schicht 2, auswirkt. Dies lässt zwei Erklärungsansätze zu. Unter Anwesenheit von ASA und Metallionen, zum Beispiel Kupfer, bildet sich im Kammerwasser H_2O_2 (**Spector et al., 1998**). Aus dem Kammerwasser in die Linse diffundierendes H_2O_2 könnte zur Oxidation der SH-Gruppen beitragen. Der zweite wichtige Erklärungsansatz betrifft das einfallende Licht. Während für elektromagnetische Strahlung bis 300 nm die Hornhaut den Hauptfilter darstellt, erreichen etwa 50% der Strahlung im Bereich von 300-400 nm die Linse und werden von dieser absorbiert. (**Zigman et al., 1979; Augustin et al., 2001**). Auf jeden Fall sind die vordere Linsenschichten durch dieses Licht stärker belastet als der Nukleus oder hintere Kortex. Licht der Wellenlänge von 295 bis 380 nm sowie der blaue, energiereiche Anteil des sichtbaren Lichts können über photodynamische Prozesse zur Erzeugung von H_2O_2 und Singulett-Sauerstoff führen und so zur Kataraktentstehung beitragen. Fraglich bleibt, inwieweit die Schlachttiere während ihres rund 8-monatigen Lebens überhaupt dem Sonnenlicht ausgesetzt waren.

In den Messungen dieser Studie zeigte sich, dass Regionen mit hohem Eisengehalt, wie der hintere Polbereich, in vielen Fällen keinen hohen Anteil oxidierte SH-Gruppen aufweisen. Lediglich Schicht 2 des vorderen Rindenbereiches zeigte gegenüber den Nachbarregionen sowohl einen hohen Eisengehalt als auch Zeichen starker oxidativer Belastung. Die ermittelten Daten zeigen die hohe Belastung durch ROS, denen besonders der vordere Kortex ausgesetzt ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nicht nur ein einziger Mechanismus für den oxidativen Stress, der zur Oxidation eines Teils der SH-Gruppen von wasserlöslichem Protein führte, verantwortlich gemacht werden muß. Vieles spricht in diesem Zusammenhang für eine multifaktoriell bedingte Proteinalterung und Kataraktogenese. Erst das Zusammenwirken mehrerer Stressfaktoren und die Insuffizienz antioxidativen Schutzes verursachen die Ausbildung einer Katarakt. Die Tatsache, dass der oxidative Stress im untersuchten Material noch nicht zur

Anhäufung von AGE in besonders oxidativ belasteten Regionen führte, mag auf das noch junge Alter der Tiere und die damit zu erwartende hohe Verfügbarkeit von Antioxidantien zurückzuführen sein.

In den Ergebnissen der SH-Gruppenbestimmung zeigte sich deutlich der unterschiedliche Cysteingehalt der Proteine einzelner Linsenregionen. Er zeigte ein Maximum im Kern und fiel gleichmäßig ab zum hinteren und vorderen Kortex. Der Kern enthält große Mengen an γ -Kristallin, der Kortex hingegen vorwiegend β - und α -Kristallin. Gamma-Kristallin enthält 5-10 Cystein-Reste, β -Kristallin 2-5 Cystein-Reste, α A Kristallin einen und α B-Kristallin kein Cystein (**Swiss-Prot database, <http://us.expasy.org/sprot/>**).

Bleibt in diesem Zusammenhang festzuhalten, dass das in dieser Studie untersuchte Linsenprotein deutliche Zeichen oxidativen Stresses zeigte. Auch wenn die eindeutige Zuordnung dieser Veränderungen zu bestimmten Ursachen noch Probleme bereitet, stellt die Chemie der SH-Gruppen nach wie vor einen entscheidenden Schlüssel zur Aufklärung oxidativer Schäden am Auge dar.

5. Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen sich problemlos integrieren in den aktuellen Stand der Kataraktforschung. Diese stellt als vermutete Pathomechanismen der Kataraktentstehung oxidative Geschehen und daraus resultierende irreversible Schäden des Linsengewebes in den Mittelpunkt. Die Akkumulation geschädigten Linsenproteins, das einem sehr geringen „turn over“ unterliegt, führt zur fortschreitenden Eintrübung der Linse. Eine besondere Rolle wird dabei zweifellos den redoxaktiven Metallionen und den durch sie katalysierten Reaktionen zu Teil, weshalb besonderes Augenmerk in dieser Studie auf sie gerichtet wurde.

Die neuen Erkenntnisse, die sich aus dieser Arbeit ergeben, beruhen in erster Linie auf der Messung der Eisenionenkonzentration von Linsenprotein. Sie zeigen, dass in extrahiertem wasserlöslichen Protein aus unterschiedlichen Regionen der Linse stark differierende Konzentrationen dieses Metalls nachgewiesen werden können. Besonders hoch war der Eisengehalt im Rindenbereich der Linse. Mit Hilfe der Daten von **Bours und Ahrend (1992)** wurde die Eisenkonzentration im Linsenfrischgewebe berechnet, um der unterschiedlichen Proteinkonzentration in den verschiedenen Linsenregionen Rechnung zu tragen. Auch in diesem Falle zeigt sich eine vermehrte Anreicherung von Eisenionen in der Rinde, wobei die Unterschiede zum Eisengehalt des Kerns geringer ausfielen als im getrockneten Protein.

Ergänzt wurde der Eisenionennachweis durch Bestimmung weiterer Parameter des Gewebes, die als Indikatoren oxidativen Stresses und Modifikation von Kristallinen akzeptiert sind. Es fand sich wenig Übereinstimmung zwischen den Anzeichen für oxidativen Stress der Gewebe und der nachgewiesenen Eisenkonzentration. Die Resultate weisen darauf hin, dass nicht nur eine einzelne Ursache für die Eintrübung der Linse verantwortlich ist. Die altersbezogene Katarakt stellt sich somit als multifaktorielles Geschehen im Linsengewebe dar.

Nach wie vor gibt es zur operativen Entfernung von Katarakt-Linsen keine wirksamen Behandlungsalternativen. In vielen Studien wurde beschrieben, dass oxidative Schäden, insbesondere durch UV-Einstrahlung, eine wichtige Rolle bei der Kataraktogenese spielen. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen diese Theorie. Viele Autoren postulieren daher die Prophylaxe der Katarakt bei gefährdeten Personen mit Antioxidantien. In der REACT-Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Einnahme hoher Dosen an Vitamin C, Vitamin E und Beta-Karotin über den Zeitraum von 3 Jahren die Progression der senilen Catarakt bei einem

Teil der Patienten signifikant verlangsamen kann (**Schalch und Chylak, 2003**). Andere Studien wie die AREDS-Studie konnten dagegen einen derartigen Effekt nicht nachweisen (**AREDS report no.9., 2001**).

Die Prophylaxe mit Antioxidantien stellt eine interessante Option für die Zukunft dar, die es mit weiteren Daten zu überprüfen gilt. Der Wert einer derartigen Prophylaxe ergibt sich besonders aus der Tatsache, dass die Katarakt nach wie vor die weltweit häufigste Ursache für Erblindung ist, und die chirurgische Therapie flächendeckend nur in den Industrieländern zur Verfügung steht (**Schalch und Chylak, 2003**). Eine weitere, dringend empfehlenswerte Maßnahme der Kataraktprophylaxe ist wirksamer UV-Schutz (**West, 1999**).

Für die Forschung, welche die Entstehungsmechanismen der Katarakt auf biochemischer Ebene entschlüsseln möchte, gibt es ein zentrales Problem. Durch die Finanzen generierende, komplikationsarme und effektive operative Behandlung ist das klinische Interesse an den Ursachen der Katarakt gering. Eine gute Zusammenarbeit zwischen der klinischer-operativen Behandlung und der experimentellen Forschung ist daher elementar, um die Entstehungsmechanismen der Katarakt zu verstehen.

In der biochemischen Kataraktforschung besteht Bedarf an weiteren Erkenntnissen zu der Speicherung von divalenten Metallkationen (in erster Linie Eisen und Kupfer) in Zellen und ihre komplexen Wechselwirkungen mit Proteinen, DNA und Lipiden. Auch fehlen noch viele Erkenntnisse zur Zusammensetzung und molekularen Struktur der AGE. Viele Faktoren, die zur Kataraktbildung beitragen, sind bekannt. Entscheidend ist es, noch weitere Faktoren zu identifizieren und ihr Zusammenspiel zu verstehen. Was die vorliegende Studie betrifft, bietet es sich an, den Nachweis von Metallionen und die Bestimmung von Parametern des oxidativen Stresses an Linsenprotein älterer Tiere bzw. an Protein, dass durch UV-Bestrahlung einem künstlichen Alterungsprozess unterworfen wurde, zu wiederholen. Durch den Vergleich von Daten verschieden alter Tiere ließen sich Veränderungen erkennen, welche Teil von natürlichen und pathologischen Alterungsprozessen sind

Langfristiges Ziel sollte es sein, Risikopatienten bereits vor der Entstehung einer Katarakt zu finden und die Pathomechanismen günstig zu beeinflussen. Die große weltweite Bedeutung der Katarakt, sowie die zahlreichen Parallelen zu anderen Krankheitsbildern, die ebenfalls mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden, fordern weiteres wissenschaftliches Engagement, um die verbleibenden Fragen und Probleme zu lösen.

6. Zusammenfassung

Oxidative Modifikationen von Linsenprotein sind nach heutigen Wissen ein wesentlicher Faktor der Kataraktentstehung. Ziel der vorliegenden Studie war es, Zusammenhänge zwischen der Radikalbildung durch redoxaktive Eisenionen und oxidativen Schäden an Protein zu erforschen.

Mit Hilfe der Ferrene S-Methode wurden die Konzentrationen der Eisenionen in wasserlöslichem Protein aus verschiedenen Regionen der Linse nachgewiesen. In Ansatz 1 und 2 wurde der Versuch unternommen, direkt in der Proteinlösung Eisenionen nachzuweisen, was aufgrund von Gelbildung im Reaktionsgefäß nicht gelang. In Ansatz 3 wurde Eisen schließlich in proteinfreier Lösung nachgewiesen. Es viel auf, dass sich die Werte der Regionen der Linse stark unterschieden. Die höchsten Werte für Eisen wurden im Protein oberflächennaher Schichten gefunden. Die Region mit dem niedrigsten ermittelten Wert wies nur 44% des Gehaltes der eisenreichsten Schicht auf.

Amadori-Produkte der frühen Glykosilierung, nachgewiesen im NBT-Test, reichern sich in der Linse in vor allem in der Äquatorregion an. In den Schichten vom vorderen zum hinteren Pol ist Fruktosamin relativ gleichmäßig verteilt. In diesem Bereich wurden Konzentrationen gemessen, die zwischen 33,4% und 57,5% niedriger lagen als die Werte des Äquators.

Carbonylgruppen, die als Marker für die Ansammlung irreversibel oxidierten Linsenproteins durch metallkatalysierte Oxidation gelten, ließen sich in allen Bereichen der Linse in ähnlichem Maße nachweisen. Der höchste Wert wurde für Schicht 2 festgestellt (0,586 nmol/mg Prot.), der niedrigste für Schicht 1 (0,443 nmol/mg Prot.; basierend auf der BCS-Methode).

Der Nachweis der SH-Gruppen zeigte, dass im Kern der Linse der SH-Gruppengehalt der Kristalline besonders hoch ist (bis zu 225,29 nmol/mg Protein in Schicht 3). In den vorderen kortikalen Schichten der Linse lagen bis zu 61,8% der SH-Gruppen des wasserlöslichen Linsenproteins in oxidiertem Zustand vor.

Die inhomogene Eisenverteilung in der Linse weist darauf hin, dass die Kristalline der verschiedenen Linsenregionen unterschiedliche Metallbindungseigenschaften besitzen. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass oxidativ verändertes Protein in der Lage ist, vermehrt Eisenionen zu binden. Die Ergebnisse der SH-Gruppenbestimmung zeigen darüber hinaus, dass das untersuchte Linsengewebe einem hohen oxidativen Stress ausgesetzt ist, dem die körpereigenen,

antioxidativen Schutzmechanismen, in erster Linie das Glutathionsystem, nur teilweise gewachsen sind.

Obwohl es zur Zeit keine Alternative zur Katarakt-Operation gibt, wird von einigen Autoren die Kataraktprophylaxe mit Antioxidantien empfohlen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen grundsätzlich für den Sinn einer derartigen Prophylaxe, auch wenn es in der Literatur nur vereinzelte Nachweise einer Wirksamkeit gibt.

Als Fazit kann gelten, dass neben klinischen Studien noch viel Forschung auf molekularer Ebene notwendig ist, um die Mechanismen zu entschlüsseln, die an der Kataraktentstehung beteiligt sind.

7. Literaturverzeichnis

Andley UP, Song Z, Wawrousek EF, Fleming TP. Differential protektive Activity of α A- and α B-crystallin in Lens epithelial cells. J Biol Chem **2000**; 275, No 47: 36823-36831

AREDS report no.9. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss. Arch Ophthalmol **2001**; 119(10): 1439-1452

Argirova MD, Breipohl W. Glycated protein can enhance photooxidative stress in aged and diabetic lenses. Free Radic Res **2002**; Dec; 36(12): 1251-1259

Argirova MD, Ortwerth BJ. Activation of protein bound copper ions during early glycation: study on two proteins. Arch Biochem Biophys **2003**; Dec 1; 420(1):176-184

Augustin AJ, Dick HB, Winkgen A, Schmidt-Erfurt U. Ursache und Prävention oxidativer Schäden am Auge. Der Ophtalmologe **2001**; 98: 776-797

Baynes, JW. Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. Diabetes **1991**; 40: 405-412

Berg MV. Regionale Untersuchung des harnstofflöslichen Proteins der wasserunlöslichen Fraktion von Rinderlinsen. Quantitative Darstellung im Verlauf des Alterungsprozesses mittels elektrophoretischer Trennverfahren. Dissertation an der medizinischen Fakultät der Universität Bonn, **1997**

Bloemendal H. Molecular et cellular biology of the eye lens. **1982**; ISBN 0-471-05171-3, Signatur Zentralbibliothek für Medizin, Köln 1982A 1071

- Bours J, Ahrend HJ. Crystallin and water content of the aging bovine lens: cross-sectional view by microsectioning perpendicular to the optic axis. *Pog. In Veterinary and Comparative Ophthalmology* **1992**; Vol 3 ,No 4: 141-148
- Bradford M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**; 72: 248-254
- Bours J. Species specificity of the crystallins and the albuminoid of the ageing lens. *Comp Biochem Physiol* **1980**; 65B, 215-222
- Cabiscol E, Levine RL. Carbonic anhydrase III, oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging. *J Biol Chem* **1995**; Vol 270, 14742-14747
- Cheriant M, Smith JB, Jiang XY, Abraham EC. Influence of protein-glutathion mixed disulfide on the chaperone-like function of α -Kristallin. *J Biol Chem* **1997**; Vol 272, No 46: 29099-29103
- Doss-Pepe EW, Carrew EL, Koretz JF. Studies of the denaturation patterns of bovine alpha-Kristallin using an ionic denaturant, Guanidin-HCL and a non-ionic denaturant, urea. *Exp Eye Res* **1998**; 67: 657-679
- Domscheit J. Auswirkungen von UV-Strahlung auf bovine Linsenepithelzell-DNA: Schädigungsmuster, Reparaturverhalten und Zellzyklusabhängigkeit. Dissertation an der medizinischen Fakultät der Universität Bonn **1998**;
- Fu S, Dean R., Southan M, Truscott R. The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis. *Biol Chem* **1998**; 273, No 44: 28603-28609
- Fujimoto S, Kawakami N, Ohara A. Nonenzymatic glycation of transferrin: decrease of iron-binding capacity and increase of oxygen radical production. *Pharm Bull* **1995**; 18: 396-400

- Garland D. Role of site specific, metal catalysed oxidation in lens aging and cataract: A hypothesis. *Exp Eye Res* **1990**; 50: 677-682
- Garner B, Davies MJ, Truscott RJW. Formation of hydroxyl radicals in the human lens is related to the severity of nuclear cataract. *Exp Eye Res* **2000**; 70: 81-88
- Garner B, Roberg K, Qian M, Eaton JW, Truscott RJW. Distribution of ferritin and redox-active transition metals in normal and cataractous human lenses. *Exp Eye Res* **2000**; 71: 599-607
- Grossweiner LI. Photochemistry of proteins: a review. *Curr Eye Res* **1984**; 3: 137-145
- Hanson SRA, Hasan A, Smith DL, Smith JB. The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens Kristallins are disulfide-bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage. *Exp Eye Res* **2000**; 71: 195-207
- Hockwin O, Ahrendt MHJ, Bours J. Correlation of Scheimpflug Photography of the anterior Eye segment with biochemical analysis of the lens. *Graefe's Arch Clin. Exp .Ophtalmol* **1986**; 224: 265-270
- Hockwin O, Schmutter J. Müller HK Untersuchung über Gewicht und Volumen verschieden alter Rinderlinsen. *Graefe's Arch Clin Exp Ophtalmol* **1963**; 166: 136-151
- Jahngen-Hodge J, Taylor A, Shang F, Huang LL, Mura C. oxidative stress to lens Kristallins. *Methods Enzymol* **1994**; 233: 512-522
- Kossman KT. Copper in serum measured with the cobra bio centrifugal analyser. *Clin Chem* **1983**; 29: 578
- Lii CK, Chai YC, Zhao W, Thomas JA, Hendrich S. S-thiolation and irreversible oxidation of sulfhydryls on carbonic anhydrase III during oxidative stress in hepatocytes: a method for studying protein modification in intact cells and tissues. *Arch Biochem Biophys* **1994**; 308: 231-239

- Lou MF. Redox regulation in the lens. *Prog Retin Eye Res* **2003**; 22 (5): 657-682
- Lou MJ, Dickerson JE, Garadi R. The role of protein-thiol mixed disulfides in cataractogenesis. *Exp Eye Res* **1990**; 50: 819-826
- Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: A mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem and Biophys Res Commun* **1990**; 173: 932-939
- Nuttal SL, Martin U, Sinclair AJ, Kendall JJ. Glutathione: in sickness and in health. *Lancet* **1998**; 351: 645-646
- Obara Y. The oxidative stress in the cataract formation. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **1995**; 99: 1303-1341
- Ookawara T, Kawamura N, Kitagawa Y, Taniguchi N. Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. *J Biol Chem* **1992**; 267: 18505-18510
- Ortwerth BJ, Speaker JA, Prabhakaram M, Lopez MG, Li EY, Feather MS. Ascorbic acid clycation; The reaction L-threose in lens tissue. *Exp Eyr Res* **1994**; 58: 665-674
- Qian M, Lui M, Eaton JW. Transition metals bind to glycated proteins forming redox active “glycochelates”: Implication for the pathogenesis of certain diabetic complications. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**; 250: 385-389
- Reddy GB, Reddy PY, Suryanarayana P. α A- und α B-Kristallins protect glucose-6-phosphate dehydrogenase against UVB irradiation-induced inactivation. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**; 282: 712-716
- Reznik A, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* **1994**; 233: 357-363

- Sakurai T, Tsuchiya S. Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Lett* **1988** ; 236: 406-410
- Schalch W, Chylak LT. Antioxidant micronutrients and cataract. Review and comparison of the AREDS and REACT cataract studies. *Ophthalmology* **2003**; 100 (3): 181-189
- Seligman PA, Scleicher RB. Comparison of methods used to measure serum iron in the presence of iron gluconate or iron dextran. *Clin Chem* **1999**; 45, No. 6: 898-900
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bichionic acid. *Anal Biochem* **1985**; 150: 76-85
- Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J* **1995**; 9: 1173-1182
- Spector A, Ma W, Wang RR. The aqueous humor is capable of generating and degrading H₂O₂. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **1998**; 39 (7) : 1188-1197
- Varma SD, Chand D, Sharma YR, Kuck JF, Richard RD. Oxidative stress on lens and cataract formation: role of light and oxygen. *Curr Eye Res* **1984**; 3: 35-57
- Thomas JA, Mallis RJ. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Exp Gerontol* **2001**; 36: 1519-1526
- Welch KD, Zane Davis T, Van Eden ME, Aust SD. Deleterious iron mediated oxidation of Biomolecules. *Free Radical Biol Med* **2002**; Vol32, No: 577-583
- West S. Ocular ultraviolet B exposure and lens opacities: a review. *J Epidemiol* **1999**; 9 (suppl.6): 97-101

Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging. *Free Radical Biol Med* **1991**; 10: 339-352

Yegorova S, Liu A, Lou MF. Human lens thioredoxin: molecular cloning and functional characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2003**; 44 (8) : 3263-3271

Zigman S, Datiles M, Torczynski E. Sunlight and human cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **1979**; 18 : 462-467

8. Anhang

8.1 Auflistung sämtlicher Agentien, Materialien und Geräte:

Agentien:

- Ammoniumhydrogencarbonat: NH_4HCO_3 von ICN Biomedicals GmbH, Deutschland
- Ascorbinsäure von Sigma Chemicals Co., USA
- BCA-Protein-Kit von Uptima, Frankreich
- BCS: Bathocuproindischwefelsäure als Dinatriumsalz von Sigma Chemicals Co., USA
- Coomasie Blue G 250 von Merck, Deutschland
- DNPH: 2,4-Dinitrophenylhydrazin von Merck, Deutschland
- DTNB: 5,5-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) von Sigma Chemicals Co., USA
- DTT: Dithiothreitol von Merck, Deutschland
- EDTA: Dinatrium-Ethylendiamintetraazetat von Sigma Chemicals Co., USA
- Eisenchlorid: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ von Merck, Deutschland
- Essigsäure 100% von Merck, Deutschland
- Ethanol: Alkohol absolut, Universitätsapotheke Bonn, Deutschland
- Ethylacetat von Merck, Deutschland
- Ferrene S: (2-(2-Pyridyl)-5,6-bis(2-(5-Furylsulfonsäure)))-1,2,4-Triazin als Dinatriumsalz von Sigma Chemicals Co., USA
- Glutathion von Merck, Deutschland
- Guanidin-Hydrochlorid von Sigma Chemicals Co., USA
- Kupferchlorid: CuCl_2 von Merck, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat: NaHCO_3 von Merck, Deutschland
- Natriumhydrogenphosphat: Na_2HPO_4 von Merck, Deutschland
- Natriumbicarbonat: Na_2CO_3 von Merck, Deutschland
- Natronlauge: NaOH 1N von Merck, Deutschland
- NBT: Nitroblau-Tetrazolin von Sigma Chemicals Co., USA
- Phosphorsäure: H_3PO_4 85% von Merck, Deutschland
- Salzsäure: HCl 2,5N/1N von Merck, Deutschland
- SSA: Sulfosalicylsäure von Merck, Deutschland
- TCA: Trichloressigsäure von Merck, Deutschland

-Tris : Hydroxymethylaminomethan von ICN Biomedicals, Inc.; USA

Geräte und Materialien

-Mehrzweckgefäß mit Deckel (Inhalt 15 ml) von Greiner, Deutschland

-Mehrzweckgefäße (Inhalt 1,5 und 2 ml) von Eppendorf

-Photometer: Modell DU 650 von Beckmann

-Zentrifuge Modell J-25I von Beckmann

-Zentrifuge Modell 5417R von Eppendorf

8.2 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der gesamten Zusammenarbeit danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Breipohl, Medizinische Fakultät der Universität Bonn, Leiter des Instituts für Experimentelle Ophthalmologie und später von Bonn Department of International Medical Education and Development (Bonn MED ID).

Für die Hilfe im Labor, Begleitung während des Projektes und ihrem fachlichen Rat herzlichen Dank an Frau Assoc. Prof. Dr. Mariana Argirova.

Für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft danke ich ebenfalls Herrn Dipl. Biol./Biochem. Michael Ahrend und Herrn Heiko Landwehr.

Vielen Dank auch an meinen Bruder Jascha, Daniel Dürr und Peter Krings für ihr Engagement beim Korrekturlesen und ihre Anregungen.

8.3 Abkürzungsverzeichnis

(Zahlenangabe verweist auf die Seite der Abkürzungseinführung)

AGE	advanced glycation end products (8)
ASA	ascorbic acid (7)
BCA	Bichinonsäure (26)
BCS	Bathocuproine disulfonic acid (21)
CML	Carboxymethyllysine (8)
Destill.	Destilliert (13)
DHA	Dehydroaskorbat (47)
DETEPAC	Diethylentriaminpentaacetat (9)
DNPH	Dinitrophenylhydrazin (25)
DTNB	Dithionitrobenzoesäure (27)
DTT	Dithiotreitol (33)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (9)
EGP	early glycation products (8)
GSH	Glutathion (7)
GSSG	oxidiertes Glutathion (59)
NBT	Nitrotetrazolblau-Chlorid (23)
PSSG	gemischtes Disulfid Protein-Glutathion (59)
ROS	reactive oxygen species (7)
RT	Raumtemperatur (17)
SH-Gruppen	Sulfhydrylgruppen/ Thiolgruppen (8)
SOD	Superoxid-Dismutase (7)
SSA	Sulfosalicylsäure (27)
TCA	Trichloroessigsäure (18)
ws	water soluble (18)
wi	water insoluble (19)